

ANTENOR AGUIAR SANTOS

**ASPECTOS MORFO-CITOQUÍMICOS DAS CÉLULAS SANGÜÍNEAS E
ULTRA-ESTRUTURAIS DE TROMBÓCITOS E GRANULÓCITOS DO
GAVIÃO CARIJÓ *Buteo magnirostris* (GMELIN, 1788) (AVE,
FALCONIFORME).**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina para obtenção do Título de
Mestre em Morfologia.**

**São Paulo
2001**

ANTENOR AGUIAR SANTOS

**ASPECTOS MORFO-CITOQUÍMICOS DAS CÉLULAS SANGÜÍNEAS E
ULTRA-ESTRUTURAIS DE TROMBÓCITOS E GRANULÓCITOS DO
GAVIÃO CARIJÓ *Buteo magnirostris* (GMELIN, 1788) (AVE,
FALCONIFORME).**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina para obtenção do Título de
Mestre em Morfologia.
Orientadora: Profa. Dra. Mizue Imoto
Egami.

**São Paulo
2001**

MODELO DE FICHA CATALOGRÁFICA PARA TESES
ELABORADO PELA BIBLAC

Santos, Antenor Aguiar.

Aspectos morfo-citoquímicos das células sangüíneas e ultra-estruturais de trombócitos e granulócitos do Gavião carijó *Buteo magnirostris* (GMELIN, 1877) (AVE, FALCONIFORME).-/Antenor Aguiar Santos.-- São Paulo, 2001.

xi, 95fl.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Morfologia.

Título em inglês: Morpho-cytochemical aspects of blood cells and ultrastructural analysis of thrombocytes and granulocytes of Gavião carijó *Buteo magnirostris* (GMELIN, 1877) (AVIAN, FALCONIFORME).

1.Células sanguíneas. 2.Granulócitos 3.Citoquímica. 4. Ultra-estrutura 5. *Buteo magnirostris*.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – ESCOLA PAULISTA DE
MEDICINA - DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA.**

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Eduardo Katchburian
**Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo L.
Smith**

ANTENOR AGUIAR SANTOS

**ASPECTOS MORFO-CITOQUÍMICOS DAS CÉLULAS SANGÜÍNEAS E
ULTRA-ESTRUTURAIS DE TROMBÓCITOS E GRANULÓCITOS DO
GAVIÃO *CARIJÓ Buteo magnirostris* (GMELIN, 1788) (AVE,
FALCONIFORME).**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wilson da Silva Sasso
Profa. Dra Helena Regina Cômodo Segreto
Profa. Dra. Lilian Munaó Diniz

Aprovada em: 15/10/2001

“O mundo precisa de homens, homens que não se comprem nem se vendem, homens que no íntimo da alma sejam verdadeiros e honestos, homens que sejam tão fiéis ao dever como a bússola o é ao pólo, homens que permaneçam firmes pelo que é reto, ainda que caiam os céus”

Ellen G. White

DEDICO ESTA TESE...

Aos meus pais

Antônio (in memorian) e Matildes,

que com muito amor, sabedoria e temor a Deus, proporcionou-me uma educação para a eternidade.

A todo os meus irmãos e em especial à *Marinei e Magna*, pelo apoio, incentivo e modelo de irmãs.

À minha companheira *Renata*, pelo carinho, motivação e compreensão demonstrados durante todo o período de dedicação na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. **Mizue Imoto Egami**, pela dedicação, paciência e plena formação acadêmica dispensada na orientação desta tese, proporcionando-me através de seu modelo de pessoa, amiga e professora o mais nobre e elevado nível de aprendizado ao longo deste convívio, o meu reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário Adventista de São Paulo na pessoa do Prof. Dr. Edson de Lara Rodrigues pela oportunidade na iniciação à pesquisa durante a graduação, por seu espírito de equipe, dinamismo e lições de vida.

À Dra. Maria José Tavares Ranzanni de Paiva, por seu apoio e ensinamento que grandemente contribuíram no meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith, coordenador do curso de Pós-Graduação em Morfologia, pela oportunidade, estímulo científico e seu esforço em propiciar as melhores condições de trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Katchburian, titular da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural, pelo apoio logístico.

Ao Prof. Dr. Oswaldo Alves Mora, responsável pelo Setor de Microscopia Eletrônica, pela orientação no manuseio do Microscópio Eletrônico.

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação, em especial ao Fábio, Sandaly, Vinícius, Marcelo e Weber pela amizade e oportunidade de convívio.

Aos professores da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da UNIFESP-EPM, pelo apoio concedido.

Aos técnicos e funcionários das Disciplinas de Histologia e Biologia Estrutural e de Hematologia, em especial à Gisela S. Scarpatti, Ruth Kuchinir Mora,

Alessandra C. Rangel Morine, Elisa Y. Sugano Kimura e Licurgo L. Carvalho pela boa vontade com que colaboraram quando solicitados.

Ao Conselho de Apoio a Pesquisa (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	13
2- MATERIAL E MÉTODO.....	23
3- RESULTADOS.....	32
4- DISCUSSÃO.....	52
5-CONCLUSÕES.....	72
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
FONTES CONSULTADAS.....	93
RESUMO.....	94

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

O interesse pela ornitologia aumentou consideravelmente desde a década de 40 no oeste do Atlântico Norte, quando se iniciou a comercialização de produtos avícolas por constituírem, principalmente, alimento de elevado teor nutritivo. A partir de então, houve um crescente interesse mundial no desenvolvimento da avicultura (LEAL, 1971). Assim, com o aumento da produção de produtos avícolas, as informações básicas relativas à higidez, nutrição e reprodução desses animais se tornaram essenciais para a criação e manutenção desses animais em cativeiro. Nesse sentido o estudo hematológico se tornou também muito importante por permitir o diagnóstico de possíveis doenças que venham acometer as aves.

Em relação ao estudo do sangue, constatou-se pela literatura que tal interesse está voltado especialmente à determinação de índices hematimétricos e dosagem dos componentes do plasma sangüíneo, estabelecendo uma associação entre os valores normais e as suas variações devido ao sexo, idade, condições climáticas, isto é, em diferentes estações sazonais, influência hormonal, hipóxia e frente a determinados hábitos alimentares (CAMPBELL, 1984; MAXWELL et al. 1991; BELTZER, 1990; ABELENDA et al. 1993; PHALEN et al. 1995; VANWIK, 1998; STUERMER, 1999). Estudos quanto aos aspectos de sua reprodução, infecção parasitária, principalmente do sangue e aos programas de monitorização de ambientes contaminados por diversas substâncias tóxicas, também são altamente explorados (NEWTON & WYLIE, 1991; MOCKEL & GUNTHER, 1991; ELLIOTT & SHUTT, 1993; JOYNER et al., 1994; FORRESTER et al., 1994; PHALEN et al., 1995; OTS & HORAK, 1996; TAFT et al., 1996 e DONALDSON, SHUTT & HUNTER, 1999).

Considerando-se ainda o estudo vinculado à Hematologia de Aves, deve ser destacado o trabalho de LUCAS & JAMAROSZ (1961) que ao descreverem os aspectos morfológicos das células do sangue periférico e as correspondentes células imaturas de diferentes linhagens da medula óssea, culminaram na elaboração de um Atlas de Hematologia de Aves, de indiscutível importância, norteando numerosos trabalhos de pesquisa desta área. Nesse sentido, nas últimas décadas sucederam-se investigações na tentativa de estabelecer os valores hematológicos padrões em diversas espécies de aves, destacando-se os trabalhos de ROSSKLOPF et al. (1982), HAWKEY et al. 1984, CAMPBELL & DEIN (1984), DEIN (1986), HARRISON & HARRISON (1988), HARRISON (1992), CAMPBELL (1988, 1994 e 1995), HAWKEY et al. (1988), NAVARRO & PACHALY (1994), DEIN et al. (1994), PHALEN et al. (1995).

Segundo BOUNOUS & STEDMAN (2000), embora existam 8600 espécie de aves conhecidas e enquadradas em 27 Ordens, os tipos de células sangüíneas dessa ampla variedade de espécies incluindo aves do tipo carenata, ratita e aquática, isto é, respectivamente aves que voam por apresentarem carenas, aves que não voam e aves que apresentam artelhos ligados por palmores, mostram de modo geral, semelhanças morfológicas.

Quanto à série eritrocítica, os primeiros estudos foram realizados nos primórdios da década de 1930 por VAUGHAN, WILLS e ORTEN, os quais observaram que quase todos os eritrócitos nucleados de aves, bem como de répteis e peixes apresentavam estruturas citoplasmáticas semelhantes à rede designadas como “reticulum”, quando submetido ao corante vital justificando o termo reticulócito para os eritrócitos com essas características morfológicas. Em estudos posteriores CAMPBELL (1995) observou em Gallus sp. e também em outras espécies de aves, uma variação na concentração do precipitado de cor azul em forma de rede no citoplasma destas células, relacionando-a com a maturação dos

eritrócitos, tal qual já era muito bem descrito em mamífero. Quanto aos eritrócitos maduros HARTMAN & LESSLER (1963), observaram em 124 espécies de aves selvagens, distribuídas em 46 famílias, que os aspectos estruturais e funcionais dessas células eram semelhantes, apresentando apenas uma pequena variação nas dimensões das mesmas entre as diferentes espécies ou raças de aves, porém, não se referindo a nenhuma relação direta entre o tamanho e peso das aves com o aumento das dimensões dos eritrócitos como relatado por HODGES, 1977.

Quanto ao estudo dos aspectos morfológicos dos leucócitos merecem destaque os trabalhos de ATWAL & McFARLAND (1966) em *Coturnix coturnix japonica*; de HAWKER, et al. (1983) em várias espécies de *Gruiformes* e de HAWKER, et al (1984) em *Phoenicopterus ruber ruber*. Merecem destaque também, os trabalhos de revisão literária realizada por MAXWELL & ROBERTSON em 1987, 1995 e 1998 sobre os eosinófilos, basófilos e heterófilos de aves domésticas.

A distinção morfológica entre as células sanguíneas, principalmente para o diagnóstico diferencial de granulócitos heterófilos e eosinófilos, às vezes de difícil caracterização por apresentarem ambos, grânulos acidófilos e dos tipos de agranulócitos, onde os trombócitos são frequentemente confundido com linfócitos, é importante para a determinação de valores hematológicos em relação à contagem diferencial de leucócitos, onde as características estruturais se constituem em dados fundamentais para a obtenção de resultados mais precisos (ROSSKOLPF & WOERPEL, 1983; CAMPBELL & DEIN 1984 e SWAYNE, STOCKHAM & JOHNSON, 1986).

Em relação à morfologia dos trombócitos, são vários os estudos existentes na literatura que relatam como sendo uma célula que apresenta uma variação quanto à sua morfologia assemelhando-se algumas vezes aos linfócitos, dificultando sua

identificação (HODGES, 1977 e SWAYNE, STOCKHAM & JOHNSON, 1986). A variação morfológica dos trombócitos fora interpretada como sendo resultante do processo de sua maturação por CAMPBELL, 2000 que observara no sangue periférico de algumas espécies de Psitacídeos, trombócitos grandes esféricos e ovais com núcleo esférico e citoplasma basófilo considerados imaturos e os de aspecto oval porém com citoplasma hialino, caracterizados como trombócitos maduros.

O estudo do aspecto morfológico das células sangüíneas, bem como a detecção e análise de substâncias componentes destas células são fundamentais para a caracterização funcional das mesmas, bem como auxiliar na sua própria identificação.

Desta forma, com relação ao estudo citoquímico das células sangüíneas e em particular à demonstração do glicogênio, devem ser destacados os trabalhos de CAXTON-MARTINS & DAIMO (1976), em *Gallus sp.*, que observaram a presença de glicogênio no citoplasma dos leucócitos heterófilos e monócitos; de SRIRAMAN et al. (1981), em *Gallus sp.* e patos, que demonstraram reação positiva no citoplasma dos trombócitos, heterófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e em células intermediárias e por fim de EGAMI & SASSO (1991), em *Gallus domesticus*, que observaram reação positiva somente nos trombócitos e heterófilos.

Quanto à detecção das proteínas estruturais, por exemplo de poliaminoácidos básicos KELÉNYI & NÉMETH (1969) realizando um estudo comparativo de células sangüíneas de diferentes classes de animais, compreendendo anfíbios, peixes, répteis e aves, observaram reação positiva, em particular nos grânulos dos heterófilos e eosinófilos de aves. Em recente trabalho de pesquisa sobre células

sangüíneas de peixe cartilaginoso PACHECO (2000) observou positividade para poliaminoácidos básicos nos grânulos dos eosinófilos.

Na detecção da mieloperoxidase, MERKAL & MORA, (1962) em *Gallus sp.* observaram uma fraca positividade , nos grânulos dos leucócitos granulócitos, sem se preocupar em especificar o tipo de granulócito em que ocorreu a reatividade; ANDREASEN & LATIMER (1990) em *Gallus sp.* e EGAMI & SASSO, (1991) em *Gallus domesticus* observaram reação positiva somente para os eosinófilos.

Na demonstração da fosfatase ácida, MERKAL & MORA (1962) observaram em *Gallus sp* um fraca positividade em trombócitos imaturos que conforme o amadurecimento mostravam um aumento da reatividade. BARKA & ANDERSON (1962) observaram uma intensa atividade enzimática nos monócitos presentes na medula óssea, moderada reatividade nos heterófilos e fraca positividade em alguns grânulos dos linfócitos do sangue periférico de *Gallus sp*; SWEENY & CARLSON (1968) demonstraram a presença desta enzima difusa nos grânulos citoplasmáticos em quase todos os trombócitos em *Gallus sp.* OSCULATE (1969) observou, com a utilização da técnica citoquímica eletrônica para fosfatase ácida, reação positiva na forma de grumos elétron-densos localizados na face interna da membrana de alguns grânulos presentes nos heterófilos. TOPP & CARLSON (1971) observaram, ao microscópio de luz, grânulos citoplasmáticos apresentando reação positiva para a fosfatase ácida, distribuídos no citoplasma dos heterófilos em peru. SRIRAMAN et al. (1981) observaram, reação positiva para a fosfatase ácida em alguns grânulos esféricos dos heterófilos, eosinófilos, linfócitos e fracamente no citoplasma dos trômbócitos em *Gallus sp.* e patos. ANDREASEN & LATIMER (1990) isolaram os eosinófilos e heterófilos do sangue periférico de *Gallus sp.* utilizando-se um gradiente descontínuo de ficol para a demonstração da fosfatase ácida, observando reação positiva somente nos grânulos dos eosinófilos.

Na detecção de lipídios, o método Sudan Black B que permite identificar fosfolipídios do sistema de membrana e uma grande variedade de lipídios intracelulares (LISON, 1960) foi utilizado por MERKAL & MORA (1962) que observaram que os precursores de leucócitos na medula óssea apresentavam maior quantidade de lipídios no citoplasma do que os leucócitos do sangue circulante em *Gallus* da variedade leghorn. ATWAL & McFARLAND (1966), relataram uma fraca e difusa positividade em todos leucócitos em *Gallus sp.* SRIRAMAN, et al., (1981) observaram grânulos sudanófilos em todos eosinófilos e ocasionalmente nos monócitos em *Gallus sp.* e em patos. EGAMI & SASSO (1991) identificaram lipídios nos grânulos dos eosinófilos, geralmente como grânulos pretos esféricos, sendo que nos heterófilos, os grânulos sudanófilos eram escassos e preferencialmente distribuídos na periferia celular.

Considerando-se agora os estudos vinculados aos aspectos ultra-estruturais dos leucócitos e trombócitos devem ser destacados os trabalhos de KELÉNY & NÉMETH (1969) que estudaram leucócitos eosinófilos de Aves e de outros vertebrados, DHINGRA, PARAISH, VENSKE (1969) que estudaram leucócitos de *Gallus domésticos*, MAXWELL & TREJO (1970) aves domésticas, MAXWELL & SILLER (1972) as características dos granulócitos eosinófilos de seis espécies de aves domésticas, MAXWELL (1973) que comparou os aspectos ultra-estruturais do heterófilo e basófilo de seis espécies de aves domésticas, MAXWELL (1978) que estudou a ultra-estrutura dos grânulos dos eosinófilos de aves terrestres e aquáticas, LEWIS, HASIBA, SPERO (1979) que estudaram os leucócitos em *Meleagris gallopavo* e MAXWELL & ROBERTSON (1987, 1995 e 1998) que se dedicaram na realização de uma revisão literária sobre eosinófilo, basófilo e heterófilo de aves.

Agora, especificamente em relação às aves da Ordem Falconiforme que compreende não só os gaviões mas também outros animais como os falcões,

águias, milhafres, abutres e outros, encontrados em várias localidades do mundo, foram encontrados estudos voltados para os mais diversos aspectos como a distribuição no ecossistema, biodiversidade migratória, hábito alimentar, parasitose, reprodução e taxonomia, sendo poucas as pesquisas referentes à hematologia desses animais (DEIN et al., 1994; PHALEN et al., 1995; DONALDSON, SHUTT & HUNTER, 1999; FERNIE & BIRD, 2001). Já quanto ao interesse relacionado aos aspectos da hematologia foram encontrados trabalhos sobre determinação de valores hematimétricos realizado por PHALEN et al. (1995) em *Accipiter striatus* e *Accipiter cooperii*, infectados por hemoparasitas; por DONALDSON, SHUTT & HUNTER (1999) em águias *Haliaeetus leucocephalus*, contaminados por organofosforado em seu ambiente natural e por LANZAROT (2001) em falcão peregrino.

Já em relação ao Gavião carijó *Buteo magnirostris*, ave encontrada no Brasil e também espalhada em todo continente Sul-Americano, não foi possível constatar após à literatura mundial compulsada nos últimos 30 anos, referência alguma sobre o estudo hematológico, mesmo em se tratando de dados mais simples, como por exemplo quanto ao aspecto morfológico das células do sangue periférico. Em relação a esta espécie, a literatura mostra interesses voltados, somente às pesquisas de natureza principalmente ecológica, taxonômica e de hábito alimentar como já referido para outras espécies da Ordem Falconiforme (BELTZER, 1990; TENDEIRO, 1990; DABERT & EHRNSBERGER, 1992; AGUILAR, 1993). Sendo assim, os resultados obtidos futuramente nesta pesquisa irão certamente contribuir no estabelecimento do perfil hematológico de aves da Ordem Falconiforme, bem como servir de parâmetro para o estudo de outras espécies que vivem no habitat natural.

Frente aos escassos dados da literatura específica acima apresentada e à importância do conhecimento das células sanguíneas e dos seus componentes, em

condições normais, como embasamento para futuras investigações e considerando-se a importância desse estudo como referência para a análise do estado de higidez destes animais em cativeiro ou no seu ambiente natural, propomo-nos no presente trabalho estudar os aspectos estruturais, citoquímicos e ultra-estruturais de trombócitos e granulócitos do Gavião carijó *Buteo magnirostris*.

MATERIAL E MÉTODO

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 14 exemplares da espécie *Buteo magnirostris*, popularmente conhecido como Gavião carijó, pertencentes à Ordem Falconiforme e à Classe Aves. Estes animais foram provenientes do Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE) da Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente do Município de São Paulo.



Fig. 01 – Fotografia do Gavião-carijó *Buteo magnirostris*.

2.2 Colheita do sangue

Para a realização das análises estrutural, citoquímica e ultra-estrutural, foram colhidas amostras de sangue periférico por punção da veia braquial, com utilização de seringa descartável marca B-D Plastipak com agulhas 30x7 parede 22g 1 1/4 com capacidade para 5 ml.

Foram colhidos aproximadamente 3 ml de sangue de cada animal, fazendo-se a imediata transferência para tubos de ensaio com tampa de borracha marca NEO-TUBE impregnados com anti-coagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) a 10% em água destilada. Deste foram utilizados 0,5 ml para aplicação do corante vital pelo método de Laür, para a realização de extensões e aplicação dos métodos de Leishman e citoquímicos descritos a seguir. O volume restante foi submetido à centrifugação e processado para análise em microscopia eletrônica de transmissão.

2.3 Método para análise estrutural das células sanguíneas

Para a descrição estrutural das células sanguíneas as amostras foram submetidas à coloração pelos métodos de Leishman e Laür, cujos resultados foram examinados ao microscópio de luz da marca CARL ZEISS, utilizando-se ocular 8x acoplada a uma objetiva de imersão de 100x, com aumento final de 800 vezes.

2.3.1 Método de Leishman

- a. Secar as extensões ao ar;
- b. Cobrir toda a extensão com corante de Leishman a 0,2% em metanol (contar o número de gotas) e deixar por 5 minutos;

- c. Cobrir com igual número de gotas de água de coloração e deixar por 10 minutos;
- d. Lavar em água corrente;
- e. Lavar em água destilada;
- f. Secar ao ar.

2.3.2 Método de Laür

- a. Pingar uma gota do corante Laur sobre a lâmina;
- b. Deixar secar;
- c. Pingar uma gota de sangue sobre a lâmina e homogeneizar com o corante;
- d. Em seguida colocar lamínula sobre a mistura (sangue e corante Laür) e deixar 10 minutos;
- e. Fazer extensão com a própria lamínula;
- f. Deixar secar;
- g. Corar com Leishman
- h. Lavar em água destilada;
- i. Secar ao ar.

2.4 Métodos citoquímicos

2.4.1 Demonstração do glicogênio pelo método do ácido-periódico-Schiff (PAS) (Mc MANUS, 1946), conforme abaixo descrito:

- a. Fixar em Gendre gelado durante 10 minutos;
- b. Lavar em água corrente por 5 minutos;
- c. Imergir em ácido periódico a 1% durante 15 minutos;
- d. Lavar em água corrente por 10 minutos;

- e. Tratar com o reativo de Schiff, durante 45 minutos;
- f. Lavar 3 vezes em água sulfurosa¹ por 3 minutos;
- g. Lavar em água corrente por cinco minutos;
- h. Passar rapidamente em água destilada;
- i. Coloração nuclear pela hematoxilina de Carazzi por 1 minuto;
- j. Lavar em água corrente por 10 minutos;
- k. Desidratar, diafanizar e montar em Entellan.

Para o controle da especificidade do método algumas extensões foram previamente tratadas com amilase salivar (LISON, 1960), em câmara úmida a 37°C, durante 1 hora. Seguiram-se as lavagens em água corrente durante 10 minutos e a aplicação do método do PAS.

2.4.2 Demonstração de poliaminoácidos básicos pelo método do Sírius Red (BOGOMOLETZ, 1980), de acordo com a técnica descrita a seguir:

- a. Fixação em vapores de formol;
- b. Lavar em água corrente por 10 minutos;
- Corar por 7 minutos em Hematoxilina de Carazzi;
- c. Lavar em água corrente por 5 minutos;
- d. Lavar em água destilada por 2 minutos;
- e. Deixar em álcool 70 % por 3 minutos;
- f. Corar pela solução de Sírius Red ² pH 10,2 por 10 minutos;

¹ Água sulfurosa:

HCl 1N.....	10,0ml
Bissulfito de sódio a 10%.....	10,0ml
Água destilada q.s.p.....	180,0ml
OBS.: Preparar no momento do uso.	

² Sírius red pH 10,2

Dissolver 0,5 g de Sírius red em 45 ml de água destilada;
 Acrescentar 50 ml de álcool etílico absoluto;
 Adicionar HCL 0,1 N até atingir o pH 10,2;
 Dissolver por agitação e deixar repousar por 2 horas;

- g. Lavar em água corrente por 10 minutos;
- h. Desidratar em série alcoólica crescente e diafanizar em xilol;
- i. Montar a lâmina em Entellan.

2.4.3 Demonstração da mieloperoxidase pelo método da orto-toluidina-peróxido de hidrogênio (JACOBS, 1958), conforme descrito a seguir:

- a. Fixar em etanol-formol (9:1) por 10 minutos;
- b. Lavar em água corrente durante 5 minutos;
- c. Imersão em solução de o-toluidina-peróxido de hidrogênio³, por 15 minutos;
- b. Lavar em água corrente, por 5 minutos;
- c. Coloração nuclear com hematoxilina de Carazzi, por 10 minutos;
- d. Lavar em água corrente, por 5 minutos;
- e. Secar ao ar.

Para o controle da especificidade da reação algumas extensões foram colocadas no mesmo meio de incubação, porém na ausência do peróxido de hidrogênio.

Adicionar lentamente 3 ml de NaCl a 20 % sob luz forte até aparecer o precipitado;
Deixar repousar overnight; Esfriar

³ Solução de orto-toluidina-peróxido de hidrogênio

Etanol	12,0 ml
Água destilada	80,0ml
O-toluidina	0,5ml
Peróxido de hidrogênio 6% (20 vol)	1,0ml

2.4.4 Fosfatase ácida segundo BARKA & ANDERSON (1962):

- a. Fixar com acetona tamponada⁴ (12°C) por 30 minutos;
- b. Lavar e secar;
- c. Colocar no meio de incubação⁵.
- d. Lavar e secar
- e. Corar com Hematoxilina
- f. Lavar e secar

2.4.5 Identificação de lipídios através do método do Sudan black B (LISON, 1960), conforme descrito a seguir:

- a. Fixar em etanol 70% por 5 segundos (RHEINGOLD & WISLOCKI, 1948);
- b. Imergir em solução de Sudan black B⁶, durante 1 hora;
- c. Passar rapidamente em etanol 70%;
- d. Lavar em água corrente por 5 minutos;
- g. Secar ao ar.

⁴ Ácido cítrico 0,03 M 168 ml (1,059g)
Citrate de sódio 0,03 M 32 ml (0,2823g)
Acetona - 300 ml Tampão acetato 0,1 M pH 5,0 - 7,4 ml

⁵ A)-Ácido acético (0,2M)
B)-Acetato de sódio (0,2 M)
14,8 ml de A mais 35,2 ml de B completa para 100 ml a pH 5,0
Naftol ASBI fosfato 2 mg (N-N Dimetil formoldeído - 200ml)
Pararosanilina 4 % e HCl 2 N 160 ml(misturar e deixar 2 minutos com NaNo₂ 160 ml)
Água destilada 2,6 ml
Misturar tudo acertar o pH a 5,4 com NaOH - 90 minutos a 37°C.

⁶ Solução de Sudan Black B:
Sudan black B.....0,3g
Etanol 70%.....100,0ml

Para o controle da especificidade do método, algumas extensões foram tratadas com mistura de clorofórmio-metanol (1:1) durante 2 horas à temperatura ambiente.

2.5 Documentação fotográfica

Foi realizada através do sistema fotomicrográfico marca OLYMPUS, modelo PM20, acoplado a adaptador para fotos, condensador universal modelo BX-UCDB e sistema microscópio modelo BX50.

2.6 Método para microscopia eletrônica de transmissão

Das 14 amostras colhidas, oito foram utilizadas para análise ultra-estrutural. Para esta finalidade o sangue colhido foi colocado em tubos de centrífuga e submetido a 2.000rpm em aparelho marca IEKE durante 15 minutos para a obtenção do creme leucocitário (ANDERSON, 1965), que foi imediatamente fixado em half Karnovsky (KARNOVSKY, 1965, modificado) e processado segundo descrito a seguir:

2.6.1 Fixação

- a. Retirar, com pipeta Pasteur, todo o plasma repousante sobre o creme leucocitário;
- b. Colocar solução half Karnovsky (2,5% de glutaraldeído e 2,0% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,2M pH 7,2), deixando por 1 hora a 4°C;
- c. Retirar, com pipeta Pasteur, os eritrócitos depositados sob o creme leucocitário;

- d. Preencher todo o espaço com solução half Karnovsky e deixar por 1 hora a 4°C;
- e. Substituir a solução de half Karnovsky por uma nova e deixar por mais 2 horas e 30 minutos a 4°C;
- f. Lavar em tampão cacodilato de sódio 0,2M pH7,2 por 2 horas a 4°C;
- g. Imergir em solução de tetróxido de ósmio a 1%, em tampão fosfato 0,2M pH7,2 acrescido de sacarose (96,1 mg/ml), 0,32 osmolar, durante 1 hora a 4°C;
- h. Lavar três vezes em solução fisiológica contendo sacarose (4,16mg/ml);
- i. Imergir em solução de acetato de uranila a 0,5% em água destilada acrescida de sacarose (10,6mg/ml), 0,32 osmolar, durante 12 horas a 4°C.

2.6.2 Desidratação

- a. Lavar em etanol a 30% por 2 minutos;
- b. Lavar em etanol a 50% por 5 minutos;
- c. Lavar em etanol 70% 2 vezes, 10 minutos cada vez;
- d. Lavar em etanol 95% 2 vezes, 10 minutos cada vez;
- e. Lavar em etanol absoluto 4 vezes, 15 minutos cada vez;

2.6.3 Inclusão

- a. Passar 2 vezes, 15 minutos de cada vez, em óxido de propileno;
- b. Agitar por rotação durante 1 hora em temperatura ambiente, na mistura de meio de inclusão⁷ óxido de propileno na proporção 1:1;
- c. Agitar em estufa a 37°C por 1 hora no meio de inclusão.

⁷ Meio de inclusão

Araldite (Ciba F-CY 205).....	11,4g
N-benzil-dimetilamina (Cargille) B.D.M.A.....	0,5ml
Anidrido dodecenil succínico - DDSA (Cargille).....	7,8g
Dibutil-ftalato (Cargille).....	0,1ml

d. Inclusão propriamente dita em estufa a 60°C, para polimerização da resina no meio de inclusão, por 72 horas.

2.6.4 Cortes finos

Foram obtidos, utilizando-se faca de vidro, em ultramicrotomo modelo Porter Blum MT-1. Os cortes com espessura de 0,5µm foram colocados sobre lâminas de vidro.

2.6.5 Coloração para cortes finos

Os cortes finos foram submetidos à coloração segundo o método de RICHARDSON, JARRET & FINKE 1960 (1% de azur II em água destilada e 1% de azul de metileno em borato de sódio) a quente durante 5 minutos. Em seguida procedeu-se a lavagem em água corrente e observação ao microscópio de luz para seleção daqueles mais indicados à retrimagem e obtenção de cortes ultra-finos.

2.6.6 Cortes ultra-finos

Foram obtidos empregando-se navalha de diamante adaptada ao ultramicrotomo modelo Porter Blum MT-1, selecionando-se os cortes de cor dourada com espessura de 60 a 90 nm. Os mesmos foram coletados em telas de cobre de 200 "mesh".

2.6.7 Contrastação para para cortes ultra-finos

Numa placa de Petri contendo parafina foram colocadas algumas gotas de solução de acetato de uranila a 2% em água destilada durante 10 minutos (WATSON, 1958), nas quais foram mergulhadas as telas contendo os cortes que permaneceram na solução por 10 minutos, lavando-as depois em água destilada.

Em seguida as mesmas foram mergulhadas em solução de citrato de chumbo⁸, onde permaneceram por cerca de 10 minutos (REYNOLDS, 1963).

2.7 Micrografia eletrônica

Para análise dos cortes ultra-finos, bem como obtenção de suas micrografias eletrônicas utilizamos microscópio eletrônico da marca CARL ZEISS modelo EM-900 a 80kV.

⁸ Solução de citrato de Chumbo:

Nitrato de chumbo.....1,35g

Citrato de sódio.....1,76g

Água bidestilada fervida.....30,0ml

Agitar durante 30 minutos. Acrescentar 8ml de uma solução de NaOH 1N, recentemente preparada, também com água bidestilada e fervida. Completar com água q.s.p. para 50ml.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Resultados morfológicos

3.1.1 Eritrócito

A forma dos eritrócitos após coloração pelo Leishman, varia de esférico a elíptico, porém com predominância da forma elíptica. O núcleo apresenta-se basófilo central e elíptico, cuja cromatina encontra-se uniformemente condensada em grumos. São encontradas também formas jovens de eritrócitos que mostram aspecto esférico, apresentando núcleo que acompanha a forma da célula e cuja cromatina apresenta regiões de menor grau de condensação associadas aos grumos de cromatina (Fig. 02). O citoplasma dos eritrócitos maduros que apresenta a forma elíptica é acidófilo e o das formas esféricas apresenta uma tonalidade acinzentada. Estes eritrócitos, cujo citoplasma se cora em cinza, mostram, quando aplicado o método de coloração vital pelo Laür, grande quantidade de precipitado de cor azul em forma de uma rede no citoplasma destas células, indicando a presença de ribonucleoproteínas. Foram encontradas também formas de eritrócitos mostrando uma graduação na quantidade desse precipitado mostrando a ocorrência do processo de maturação dos eritrócitos no sangue circulante (Fig. 03).

3.1.2 Trombócito

Os trombócitos apresentam aspecto predominantemente elíptico, podendo também apresentar forma grosseiramente esférica e oval. O núcleo basófilo ocupa grande parte do seu volume em relação ao citoplasma, mostrando cromatina relativamente condensada de forma grosseira e grumosa. O citoplasma se apresenta hialino de aspecto vacuolizado principalmente nos pólos das células,

podendo apresentar em um dos pólos um a dois grânulos azurófilos nitidamente visíveis em quase todos os trombócitos (Fig.04). Ocasionalmente observa-se trombócitos tendendo à forma esférica com núcleo grosseiramente esférico, podendo mostrar citoplasma basófilo (Fig. 05).

Figura 2

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando eritrócitos elípticos com núcleo heterocromático alongado central e citoplasma róseo. Ao centro observar um eritrócito esférico com núcleo esférico e citoplasma de tonalidade cinza-azulada. Leishman 1376 x.

Figura 3

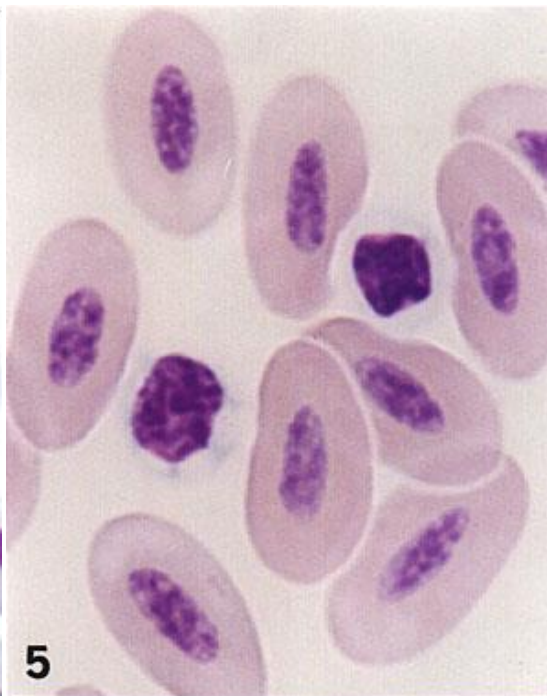
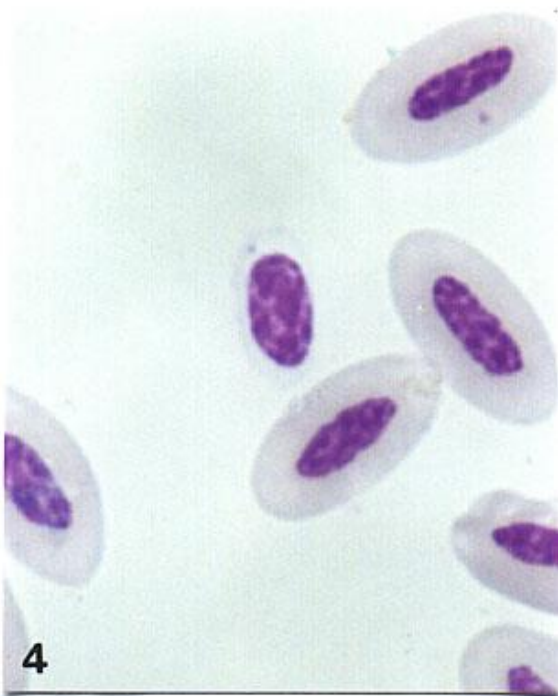
Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando um reticulócito com núcleo elíptico central e citoplasma contendo precipitado fortemente basófilo sob forma de rede. Método de Laür 1900 x

Figura 4

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando ao centro um trombócito de aspecto elíptico, com núcleo central, citoplasma hialino mostrando um grânulo azurófilo. Ao redor presença de eritrócitos. Leishman 1900 x.

Figura 5

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando dois trombócitos. À direita um trombócito com núcleo condensado, chanfradura nos dois pólos e à esquerda um trombócito mostrando núcleo volumoso. Ambos apresentam citoplasma hialino. Ao redor, presença de eritrócitos. Leishman 1900 x.



3.1.3 Heterófilo

O heterófilo é o tipo de leucócito mais comum encontrado no sangue periférico deste animal. Sua forma é esférica, podendo o diâmetro se aproximar àquele do maior eixo do eritrócito elíptico. O núcleo é lobulado deslocado para periferia, usualmente apresentando três a quatro lóbulos, porém às vezes de limites não tão bem precisos e mostrando cromatina condensada em grumos. O citoplasma é pouco corado, com presença de grânulos volumosos predominantemente acidófilos de aspecto abaulado e extremidades delgadas com refrigência na região central; podem ser encontrados também grânulos pequenos esféricos e em bastão. Alguns grânulos em forma de bastão apresentam discreta basofilia (Fig. 06).

3.1.4 Eosinófilo

São células esféricas, com núcleo lobulado, usualmente com dois a três lóbulos volumosos com cromatina em grumos. O citoplasma apresenta grânulos eosinófilos esféricos pequenos e escuros, encontrando-se distribuídos de forma compacta, em todo citoplasma e às vezes colocados sobre o núcleo, mascarando seu aspecto. Observam-se também alguns grânulos com discreta basofilia distribuídos entre eles (Fig. 07).

3.1.5 Basófilo

Os basófilos apresentam forma esférica, núcleo volumoso esférico de aspecto irregular, cromatina frouxa e ocasionalmente com nucléolo visível. O citoplasma contém grânulos fortemente basófilos, numerosos, que se dispõem muitas vezes sob forma cordonal na periferia da célula ou isoladamente sobre o núcleo

obscurecendo parcialmente a sua morfologia(Fig. 08). Foram observados também basófilos com poucos grânulos localizados somente na periferia.

3.1.6 Monócito

Célula extremamente volumosa, ultrapassando em dobro o tamanho do eritrócito, apresenta forma esférica, com núcleo em forma de rim, cromatina frouxa de aspecto vesiculoso e presença de nucléolos; o citoplasma apresenta-se uniformemente basófilo, ainda mais intensa na periferia da célula, contendo grânulos azurófilos muito finos em toda sua extensão. Frequentemente são observados vacúolos citoplasmáticos (Fig. 09).

3.1.7 Linfócito

Os linfócitos são tipicamente esféricos, apresentam nítida variação em seu tamanho, sendo possível encontrar aqueles de tamanho pequeno, médio ou grande. Nas formas média e grande é comum a presença de grânulos azurófilos podendo mostrar amplas projeções citoplasmáticas. Os linfócitos predominantes são àqueles de tamanho médio, núcleo usualmente esférico, ocasionalmente indentado, com cromatina condensada em grumos. O citoplasma é basófilo e escasso com grânulos azurófilos próximo ao núcleo (Fig. 10). Não raramente encontrados linfócitos pequenos apresentando núcleo extremamente condensado. Além disso observa-se ainda alguns linfócitos grandes que apresentam forma esférica, núcleo reniforme e cromatina frouxa mostrando amplas projeções citoplasmáticas basófilas.

Figura 6

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando ao centro um heterófilo esférico, apresentando núcleo lobulado, citoplasma com presença de grânulos acidófilos volumosos de aspecto abaulado e extremidades delgadas (\Leftarrow) e alguns grânulos bastonetiformes periféricos de coloração mais escura (σ). Ao redor presença de eritrócitos. Leishman 1900 x.

Figura 7

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico evidenciando ao centro um eosinófilo esférico, apresentando no citoplasma grânulos esféricos eosinófilos dispostos compactamente em toda extensão. Ao redor presença de eritrócitos. Leishman 1900 x.

Figura 8

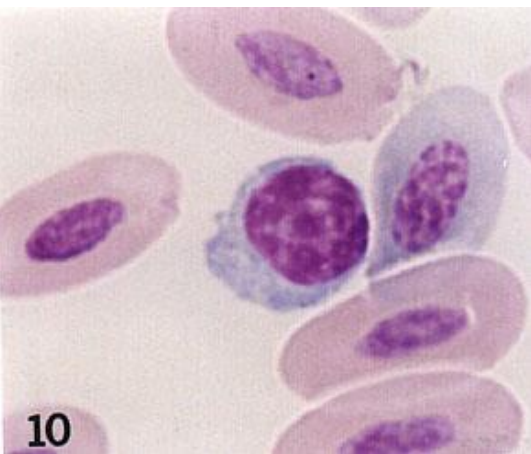
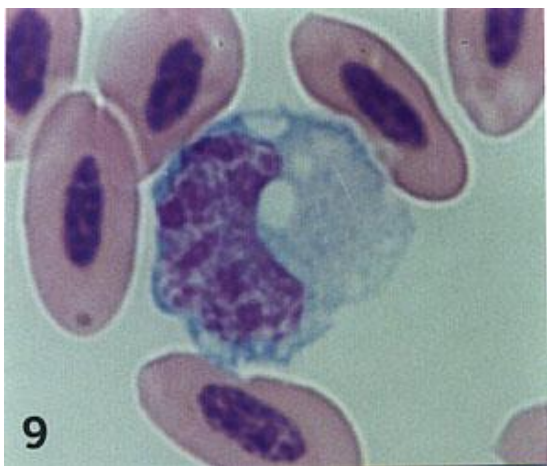
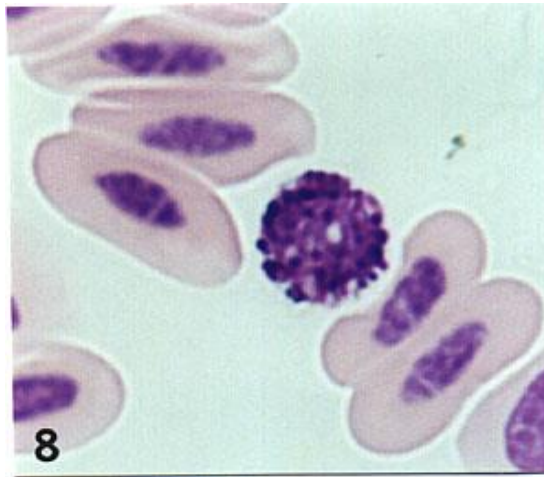
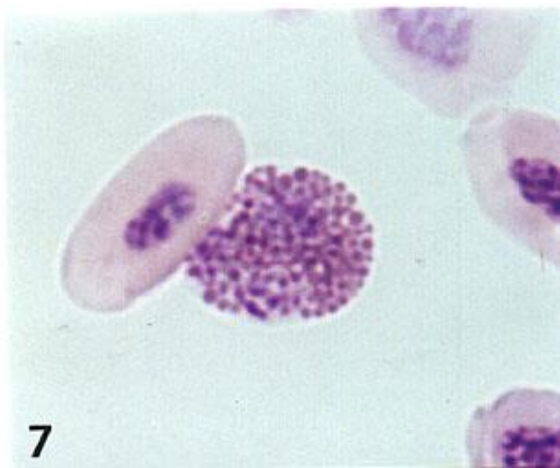
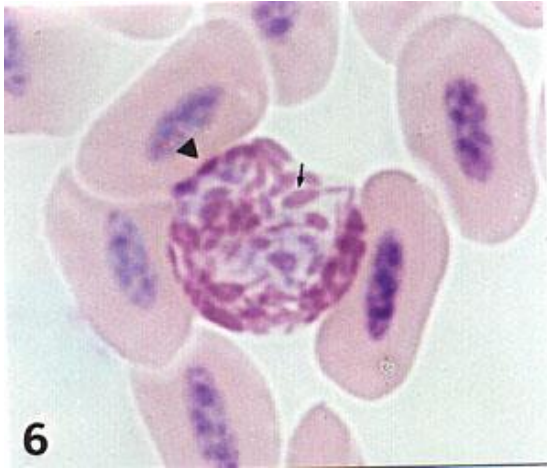
Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando ao centro um basófilo circundado por eritrócitos. Observar núcleo de aspecto vacuolizado, citoplasma mostrando alguns grânulos fortemente basófilos sobre o núcleo e sob forma cordonal na periferia. Leishman 1900 x.

Figura 9

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando ao centro um monócito circundado por eritrócitos. Observar núcleo reniforme de cromatina frouxa e nucléolos, citoplasma basófilo vacuolizado. Leishman. 1900 x

Figura 10

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando ao centro um linfócito esférico, com núcleo esférico de cromatina condensada em blocos e citoplasma basófilo. Ao redor presença de eritrócitos. Leishman. 1900 x



3.2 Resultados citoquímicos

3.2.1 Glicogênio

Após aplicação do método do PAS para a detecção de glicogênio, com controle de especificidade pela amilase salivar, observam-se grânulos de glicogênio de cor magenta circundando o núcleo nos trombócitos, e reatividade muito fraca em heterófilos e eosinófilos (Fig 11). Quanto aos demais leucócitos, não foi possível detectar a presença desta substância em nenhum dos tipos celulares.

3.2.2 Sirius Red

Após aplicação do método Sirius Red, para detecção de poliaminoácidos básicos, foi possível observar reação positiva para os trombócitos, heterófilos e eosinófilos. Nos trombócitos a reação positiva se expressa em vermelho apenas nos grânulos citoplasmáticos. Os heterófilos, em geral, mostram uma reação positiva mais intensa em relação aos eosinófilos, cujos grânulos mostram uma graduação quanto à intensidade de cor (Fig 12) e (Fig 13).

3.2.3 Mieloperoxidase

A detecção da mieloperoxidase foi realizada através do método da o-toluidina- H_2O_2 , tendo sido acompanhado pelo controle de especificidade na ausência de substrato. Somente os eosinófilos apresentam reação positiva sob forma de precipitado de cor pardo-amarelada nos grânulos citoplasmáticos, os quais estão espalhados homogeneamente (Fig. 14).

Nos demais tipos de leucócitos, não foi possível identificar a presença desta enzima com a técnica aplicada.

3.2.4 Fosfatase ácida

Após aplicação do método para identificação da fosfatase ácida, com controle de especificidade na ausência do substrato específico, os trombócitos, heterófilos e linfócitos apresentam reação positiva sob forma de precipitado de cor vermelha nos grânulos citoplasmáticos.

Nos demais tipos celulares, não foi possível identificar a presença desta enzima com a técnica aplicada.

3.2.5 Lipídio

Na identificação de fosfolipídios pelo método do Sudan Black B após controle de especificidade pela extração desta substância com mistura em partes iguais de clorofórmio e metanol, somente os eosinófilos apresentam nítida positividade em seus grânulos, mostrando sudanofilia, possibilitando visibilizar grânulos escuros esféricos compactados, distribuídos em todo citoplasma da célula (Fig 15).

Nos demais tipos de leucócitos e trombócitos, não foi possível evidenciar positividade para este método.

Figura 11

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando um heterófilo, fracamente positivo para glicogênio, associado a um trombócito apresentando grânulos visíveis de glicogênio de cor magenta ao redor do núcleo. Método PAS + Hematoxilina de Carazzi. 1900 x.

Figura 12

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando ao centro um heterófilo com grânulos de cor vermelha, positivos para Sirius Red. Método Sirius Red + Hematoxilina de Carazzi. 1900 x.

Figura 13

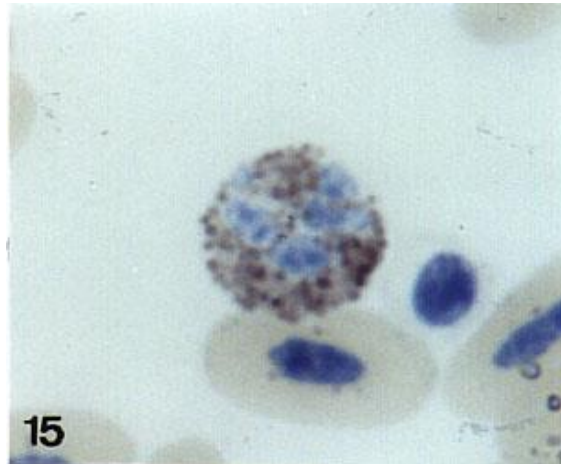
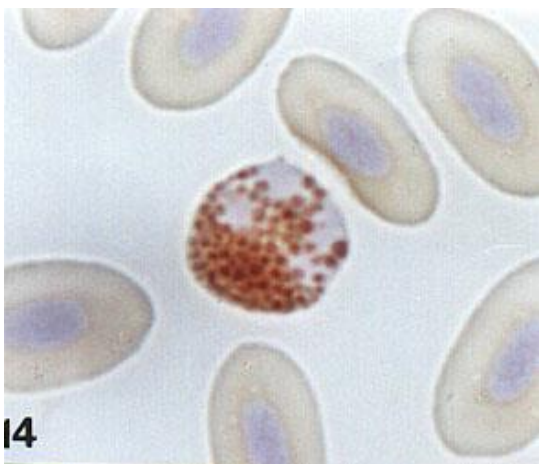
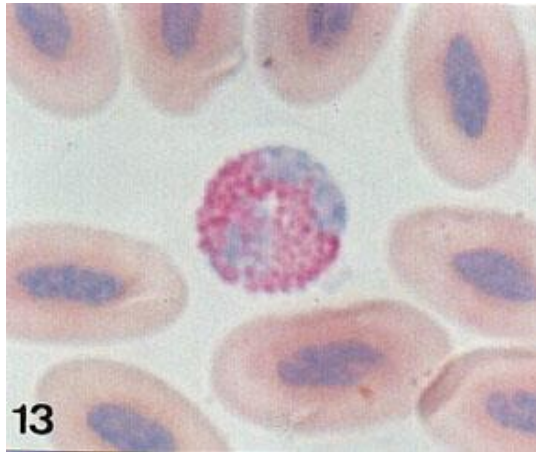
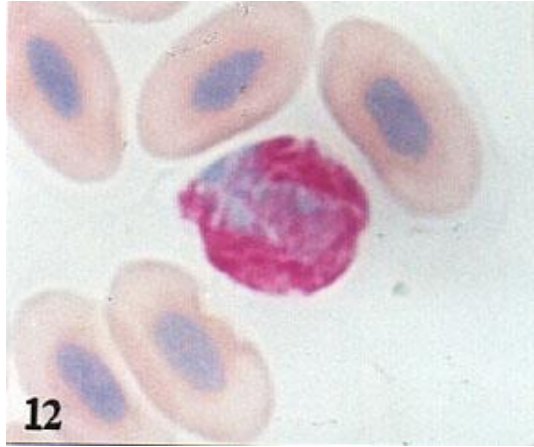
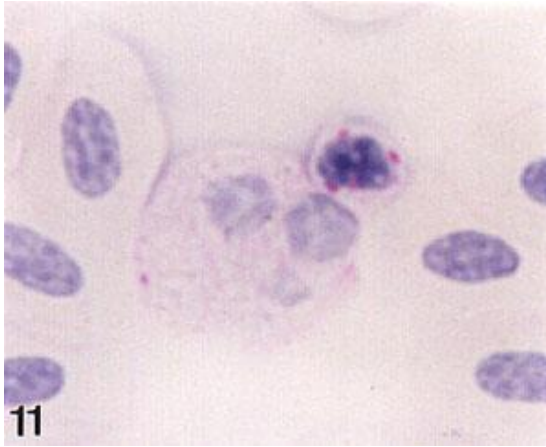
Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando ao centro um eosinófilo com grânulos esféricos de cor vermelha, positivos para Sirius Red. Método Sirius Red + Hematoxilina de Carazzi. 1900 x.

Figura 14

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando ao centro um eosinófilo , contendo grânulos esféricos de cor pardo-amarelada, mieloperoxidase positivos. Método da o-toluidina- H_2O_2 + Hematoxilina de Carazzi. 1900 x

Figura 15

Fotomicrografia da extensão do sangue periférico mostrando um eosinófilo contendo grânulos escuros esféricos sudanófilos. Método Sudan Black B + Hematoxilina de Carazzi. 1900 x



3.3 Resultados ultra-estruturais

3.3.1 Trombócito

Os trombócitos, quando observados ao microscópio eletrônico, se apresentam predominantemente elípticos, pequenos, com núcleo também elíptico e com superfície irregular e heterocromático. Pode-se observar também, trombócitos esféricos, grandes com núcleo esférico e predominantemente eucromático. Ambos os tipos apresentam características citoplasmáticas semelhantes, isto é, na região da chanfradura, vacúolos de formato irregular mostrando pequenos grânulos elétron-densos acolados na face interna dos mesmos. Alguns vacúolos apresentam estruturas semelhantes a restos de membranas e lamelas concêntricas. Foram observadas perfis de mitocôndrias com matriz elétron-densa; retículo endoplasmático, feixes marginais de microtúbulos, um sistema de túbulos, vesículas do sistema canalicular e sistema de canais abertos ligados à superfície (Fig 16).

3.3.2 Heterófilo

À microscopia eletrônica os heterófilos mostram forma esférica com pequenas projeções citoplasmáticas, núcleo lobulado, heterocromatina associada à parte interna do envelope nuclear e eucromatina central. O citoplasma apresenta três tipos de grânulos: um deles, elétron-denso, extremamente volumoso com extremidade afilada, de aspecto oval e em forma de gota. Observa-se ainda grânulos muito pequenos, comparativamente dezenas de vezes menores em relação ao descrito acima, em forma de bastão e em halteres, enquadrada no segundo tipo. A principal característica dos grânulos do segundo tipo é a presença de um material elétron-denso filamentosso no interior da matriz. O terceiro tipo, também pequeno,

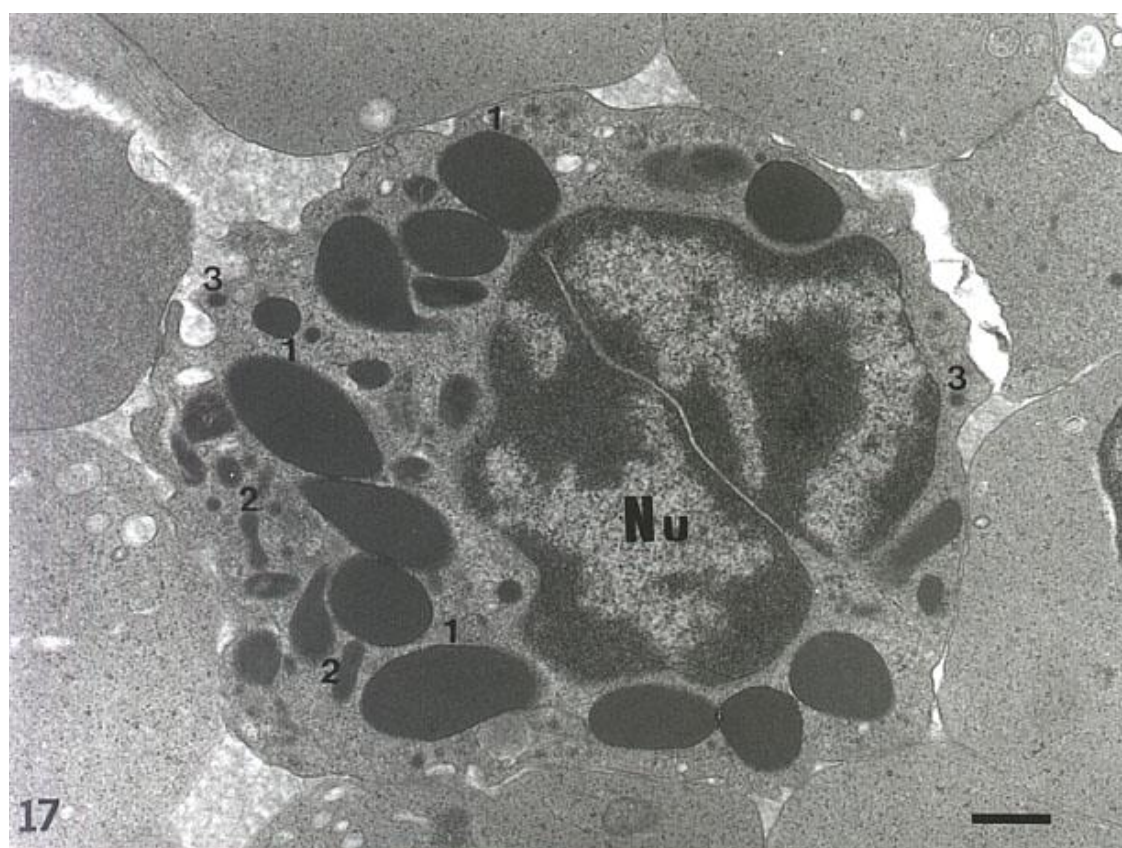
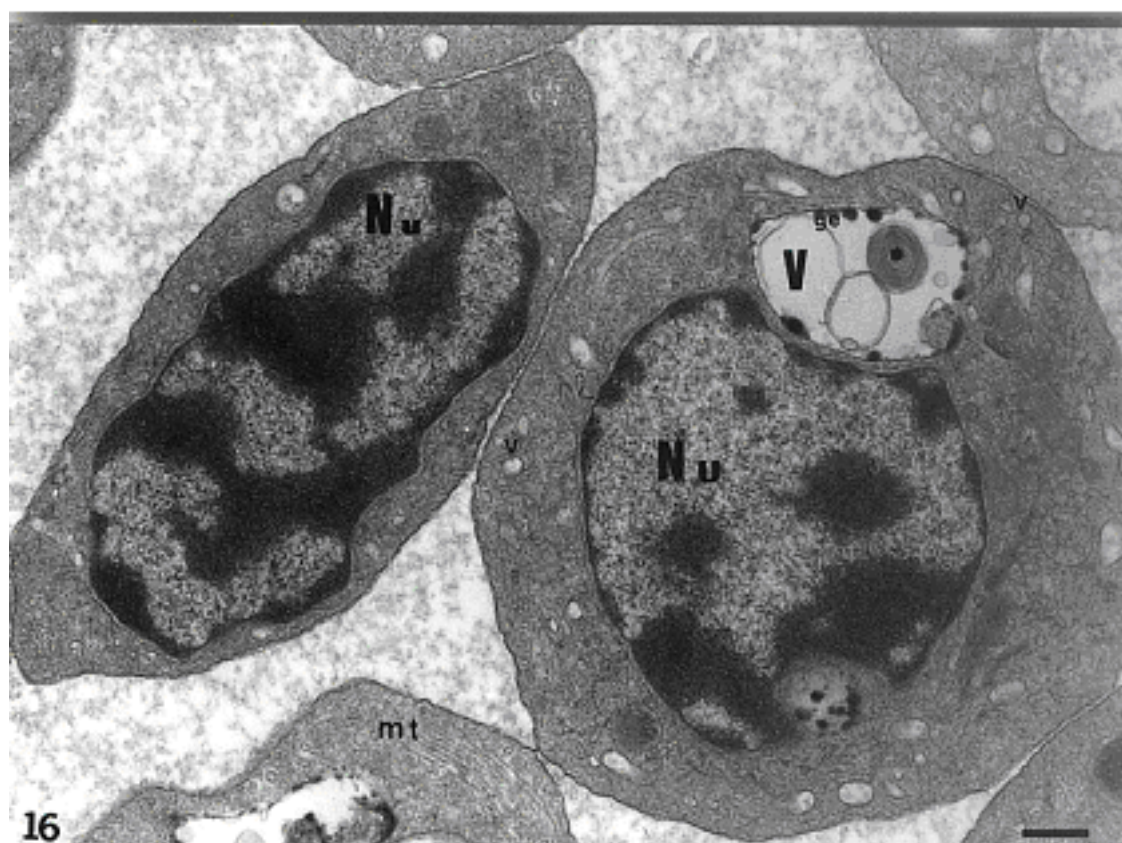
se apresenta esférico, elétron-denso aparecendo em menor número no citoplasma. Observa-se ainda mitocôndrias com matriz elétron-densa, pequenas vesículas pinocíticas, perfis de retículo endoplasmático rugoso, centríolos e um complexo de Golgi central (Fig 17).

Figura 16

Eletromicrografia mostrando dois trombócitos do sangue periférico. À direita um trombócito esférico cujo núcleo (**Nu**) esférico eucromático mostra uma chanfradura alojando um vacúolo (**V**) contendo pequenos grânulos esféricos elétron-densos periféricos (**ge**), estruturas membranosas em lamelas concêntricas (**★**) e vesículas do sistema canalicular (**v**). À esquerda um trombócito elíptico com núcleo (**Nu**) elíptico e abaixo à esquerda parte de um trombócito mostrando corte longitudinal de um feixe de microtúbulos marginais (**mt**). Barra = 0,63 μm .

Figura 17

Eletromicrografia mostrando um granulócito heterófilo do sangue periférico. Observar núcleo (**Nu**) lobulado e citoplasma contendo três tipos de grânulos: grânulo (1) apresenta-se elétron-denso volumoso abaulado e extremidade extremamente delgada.; grânulo (2) de tamanho reduzido em bastão, halteres e grânulo (3) esférico. Barra = 0,56 μm .



3.3.3 Eosinófilo

Os esinófilos mostram núcleo lobulado com heterocromatina associado à face interna da membrana nuclear, eucromatina predominantemente na região central. O citoplasma se apresenta com numerosos grânulos esféricos grandes elétron-densos, bem desenvolvidos, com pequena variação quanto ao tamanho. Observa-se em alguns destes grânulos uma constrição central e outros com a região central elétron-lúcida; nota-se ainda pequenas vesículas com minúsculos corpos densos, vesículas pinocíticas, mitocôndrias e perfis de retículo endoplasmático granular (Fig 18).

3.3.4 Basófilo

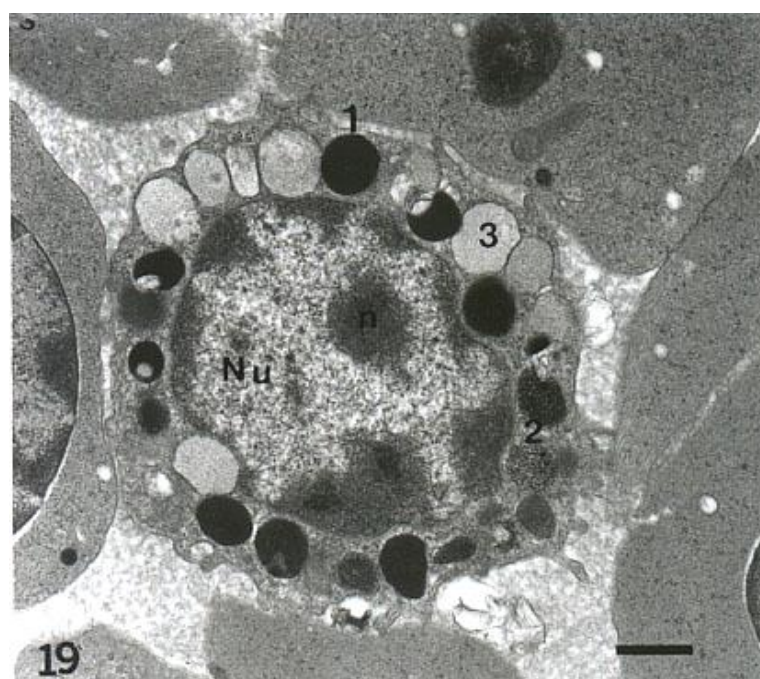
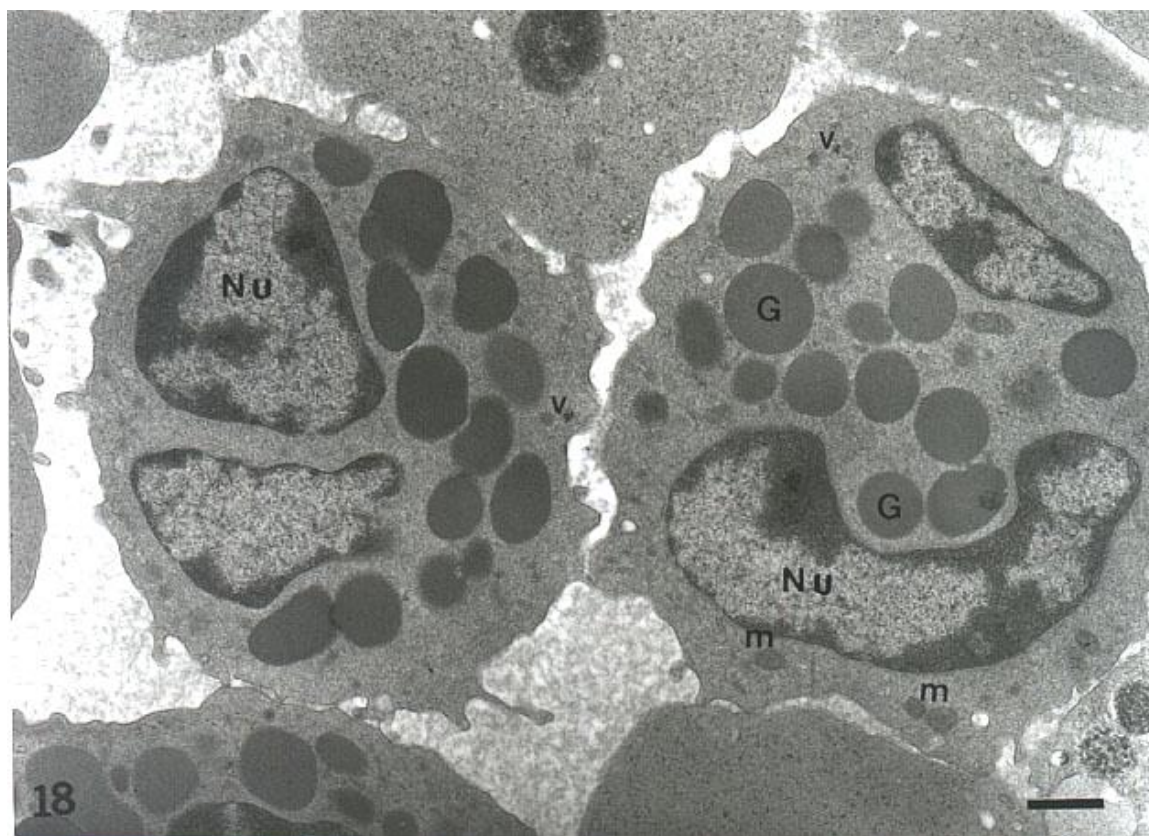
Os basófilos apresentam núcleo não lobulado, central, com depressões ocupadas por grânulos, com nucléolo central; o citoplasma contém três diferentes tipos de grânulos identificáveis de acordo com sua morfologia, colocados compactados ao redor do núcleo. O primeiro tipo apresenta-se elétron-denso, podendo alguns destes apresentar regiões elétron-lúcidas no interior do grânulo; o segundo tipo se apresenta com granulações puntiformes, assumindo um aspecto de rede e o terceiro tipo é o mais comum, apresentando aspecto finamente granular e menos denso aos elétrons. Observa-se também perfis de retículo endoplasmático granular, mitocôndrias e pequenos vacúolos (Fig 19).

Figura 18

Eletrmicrografia mostrando dois eosinófilos esféricos, com pequenas projeções citoplasmáticas, do sangue periférico. Observar núcleo (**Nu**) lobulado e citoplasma contendo numerosos grânulos esféricos elétron-densos(**G**), vesículas com corpos densos(**v**), mitocôndrias (**m**). Barra = 0,74 μm .

Figura 19

Eletrmicrografia apresentando um granulócito basófilo do sangue periférico. Observar núcleo (**Nu**) indentado, nucléolo (**n**) e três tipos de grânulos: o tipo I (**1**) esférico e elétron-denso, tipo II (**2**) de aspecto puntiforme e o tipo III (**3**) de aspecto finamente granular. Barra = 0,75 μm .



DISCUSSÃO



4. DISCUSSÃO

O interesse pela escolha do Gavião carijó *Buteo magnirostris*, espécie de animal pertencente à Classe Ave, Ordem Falconiforme, para o estudo do sangue periférico, originou-se pela falta de dados na literatura compulsada, referentes aos aspectos morfológicos, citoquímicos e ultra-estruturais de elementos figurados deste animal. É necessário considerar a importância de se conhecer os componentes celulares sangüíneos em condições normais deste animal no sentido de possibilitar a caracterização do perfil hematológico das aves desta Ordem, contribuindo para o diagnóstico clínico das possíveis doenças, para o controle da manutenção em cativeiro dos animais em condições de higiene ou mesmo auxiliando na perpetuação desta espécie no ambiente natural. Além disso, cumpre ressaltar, que este trabalho encontra-se inserido na linha de pesquisa sobre Hematologia Comparada de Vertebrados Brasileiros iniciada em 1986 na Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia UNIFESP – EPM (SASSO & EGAMI, 1986; EGAMI & SASSO, 1988 e 1991; OLIVEIRA, MOURA, MATUSHIMA & EGAMI, 1998 (a); OLIVEIRA, MOURA, MATUSHIMA, & EGAMI, 1998 (b); MOURA, MATUSHIMA, OLIVEIRA & EGAMI, 1999; VEIGA, 1999 e PACHECO, 2000).

Em relação à obtenção das amostras de sangue, os métodos de colheita utilizados em aves varia bastante, em virtude do tamanho do animal, idade e condições fisiológicas em que o mesmo se encontra (CLUBB, et al. 1991; CAMPBELL, 1994 e 1995; JOHNSON-DELANEY, 1996; RUPLEY, 1997). Assim, MILLS & WILCOX (1993), DEIN, et al. (1994) e PHALEN, et al. (1995) recomendaram o método da venipunção basílica, metatarsal, braquial, ulnares ou jugulares para aves de médio porte, isto é, com peso acima de 200 gramas, como no caso do *Buteo magnirostris*. Dentre todos esses métodos indicados, adotamos o

da venipunção braquial, por oferecer menor risco na ocorrência de formação de hematomas, o mesmo utilizado por SWAYNE, STOCKHAM & JOHNSON (1986), em *Gallus sp.* da variedade *leghorn*, MAXWELL (1986) em *Gallus gallus domesticus* e *Ana platyrhencchos*, LATIMER, et al. (1988) em *Gallus sp.*, ROBERTSON & MAXWELL (1990) em aves domésticas e BROOKS, BOUNOUS & ANDREASEN (1996) em *Gallus sp.*

É sabido que o tipo do anticoagulante interfere na preservação morfológica e coloração das células sangüíneas em aves, como referidos por STURKIE, 1976; ROBERTSON & MAXWELL 1990, ROBERTSON & MAXWELL (1993), e RUPLEY, 1997). Nesse sentido, na procura de um método que vise causar o mínimo possível de alteração estrutural das células sangüíneas do animal em estudo, as amostras do sangue periférico foram processadas com grande rapidez, utilizando-se seringas previamente tratado com EDTA 10%, na proporção de 0,2 ml de EDTA 10% para cada 1ml de sangue, pois o tempo de coagulação do sangue deste animal é muito rápido, método este também utilizado por STURKIE (1976), CAMPBELL & DEIN (1984), ROBERTSON & MAXWELL (1993), ROSSKOPF & WOERPEL, 1996 e RUPLEY (1997).

O interesse pelo estudo das células do sangue periférico neste trabalho, se deu pela dificuldade que alguns autores encontraram em identificar morfológicamente os diversos tipos de células do sangue em determinadas espécies de vertebrados (KELÉNY & NÉMETH, 1969 e SWAYNE, STOCKHAM & JOHNSON, 1986) e pela falta de dados na literatura compulsada quanto aos aspectos estruturais, citoquímicos e ultra-estruturais deste animal. É importante considerar ainda que o conhecimento dos aspectos estruturais é essencial na determinação de índices hematimétricos, que são utilizados no controle terapêutico de aves (ROSSKOLPF & WOERPEL, 1983; CAMPBELL, 1988; PHALEN, et al. 1995).

O estudo morfológico das células sangüíneas ao microscópio de luz é, de modo geral, realizado em extensões submetidas à mistura tipo Romanovsky, corante utilizado pela maioria dos autores, por se tratar de uma mistura de corantes ácido e básico, de aplicação universal, possibilitando a identificação dos diferentes tipos de célula do sangue em uma ampla diversidade de animais (ROBERTSON & MAXWELL, 1990; MAXWELL, et al. 1990; EGAMI & SASSO, 1991; MOURA, MATUSHIMA, OLIVEIRA & EGAMI, 1999; VEIGA, 1999 e PACHECO, 2000). Nesse sentido, optamos pelo corante Leishman do tipo Romanovsky, um método vantajoso por exigir pouco tempo de coloração, obtenção de maiores detalhes estruturais e fornecer resultado facilmente reproduzível.

As amostras de sangue submetidas ao método de Laür, um corante vital à base de azul brilhante de cresil, permitiu a identificação morfológica de reticulócitos desta espécie de ave conforme também referido por ARCHER (1967) e DEIN (1984) em eritrócitos de aves domésticas

Após uma cuidadosa análise das extensões sangüíneas, ao microscópio de luz, foi possível identificar e classificar todos os tipos celulares de *Buteo magnirostris*. Para tal, adotamos uma nomenclatura baseada nos aspectos morfológicos e na propriedade tintorial dos constituintes citoplasmáticos tendo sido identificados os seguintes tipos de células: eritrócitos, trombócitos, três tipos de granulócitos (heterófilo, eosinófilo, basófilo) e dois tipos de leucócitos agranulócitos (monócito e linfócito).

Tipos celulares similares àqueles acima descritos para o animal em estudo, já foram também referidos em aves domésticas por LUCAS & JAMAROSZ (1961), por HAWKER, et al. (1983) em várias espécies de *Gruiformes*, por HAWKER, et al. (1984) em *Phoenicopterus ruber ruber*, por EGAMI & SASSO (1991) em

Gallus domesticus, por PHALEN et al. (1995) em *Accipiter striatus* e *Accipiter cooperii* e por CANFIELD (1998) em aves exóticas.

Em relação aos aspectos morfológicos dos eritrócitos de aves os mesmos são nucleados, elípticos e em geral maiores, quando comparados àqueles de mamíferos (GACHTGENS, SCHMIDT, WILL, 1981 e FOURIE & HATTINGH, 1983). Segundo LUCAS & JAMROZ (1961), HARTMAN & LESSLER (1966), HODGES (1977), essas dimensões variam consideravelmente, não somente entre raças mas também entre espécies diferentes. No *Buteo magnirostris*, os eritrócitos se apresentam na corrente sangüínea sob dois aspectos: maduro e imaturo. Os eritrócitos maduros se apresentam elípticos, com núcleo central e elíptico, cuja cromatina encontra-se uniformemente condensada em blocos. Esta mesma célula foi denominada por DEINE (1984) como pancicromática e os eritrócitos imaturos cujo núcleo se apresenta menos condensado foi denominado leptocromático. Os reticulócitos, por sua vez, se assemelham aos eritrócitos maduros no tamanho e forma, mas diferem por apresentarem no citoplasma uma estrutura reticular basófila correspondente aos polirribossomos especificamente quando corados por azul brilhante de crezil. Após coloração por mistura tipo Romanovsky, os reticulócitos apresentam citoplasma mais basófilo. Os nossos resultados descritos acima, para eritrócitos e reticulócitos, foram, semelhantes àqueles observados por CAMPBELL (1995) em várias espécies de aves.

Os trombócitos de aves, são células nucleadas, tipicamente elípticas com núcleo esférico e se assemelham funcionalmente às plaquetas de mamíferos (DaMATTA et al., 1999), porém diferem morfológicamente das mesmas (DaMATTA et al., 1998b). No *Buteo magnirostris*, esta célula mostra-se predominantemente elíptica, porém ocasionalmente esférica ou oval, com o núcleo apresentando uma pequena chanfradura em uma ou ambas as extremidades e acompanhando em geral a forma da célula, o que coincide com os resultados de

SWAYNE, STOCKHAM, JOHNSON, 1986 em *Gallus sp.* Uma característica morfológica dos trombócitos que ocorre constantemente neste tipo celular é a presença de apenas um único grânulo azurófilo volumoso podendo às vezes conter grânulos menores, além de vacúolos em um ou ambos os pólos desta célula, semelhantes àqueles observados por JANZARIK (1981) em aves domésticas e por BERTRAM (1998) que caracterizou imunomorfologicamente os trombócitos de pato. Além disso, é possível observar no sangue periférico do animal em estudo trombócitos de contorno irregular, com núcleo esférico de cromatina frouxa e citoplasma basófilo, aspectos semelhantes àqueles observados por JANZARIK & MORGENSTERN (1979) em *Gallus sp.* e por CAMPBELL (2000) em algumas espécies de Psitacídeos onde os autores fazem menção ao processo de maturação dos trombócitos relacionando-o às mudanças morfológicas. Considerando-se portanto a semelhança nos aspectos morfológicos dos trombócitos deste animal é possível admitir que possam ocorrer as fases finais de maturação desta célula na circulação.

Em relação aos leucócitos granulócitos, no que se refere aos aspectos morfológicos dos heterófilos das aves, estes são funcionalmente equivalentes aos neutrófilos dos mamíferos (POWELL, 1987a,b; MONTALI, 1988; BROOKS, BOUNOUS & ANDREASEN, 1996), embora a estrutura e a propriedade tintorial dos grânulos específicos dos heterófilos sejam diferentes daqueles dos neutrófilos (ZINSMEISTER, 1988; CANFIELD, 1998). No nosso caso, os heterófilos se apresentam tipicamente esféricos, com núcleo basófilo, com três a quatro lóbulos. O citoplasma apresenta-se pouco corado, contendo numerosos grânulos acidófilos volumosos abaulados de extremidades finas com região central refrátil e menores em forma de bastão espalhados por toda a célula, sendo que alguns dos grânulos se apresentam ligeiramente basófilos, semelhantes aos dos achados de HAWKEY et al. 1982; HAWKEY et al. 1984; CANFIELD, 1998 e MAXWELL & ROBERTSON, 1998, em diversas espécies de aves.

Os eosinófilos de *Buteo magnirostris*, se apresentam esféricos, com núcleo bilobulado e mais basófilo do que nos heterófilos. A razão para a diferença da basofilia do núcleo está relacionada à presença constante de grumos de cromatina nuclear o que intensifica a basofilia, fato esse também observado por (MAXWELL, 1987). O citoplasma contém grânulos acidófilos uniformemente esféricos, com presença de alguns grânulos discretamente basófilos, o que coincide com os resultados apresentados por CANFEILD (1998) e CAMPBELL (2000) em várias espécies da família Psitacídeos. No entanto, ZINSMEISTER (1988) estudando os granulócitos do sangue periférico de *Pygoscelis adeliae*, observou que os grânulos dos eosinófilos não se coravam e se apresentavam refrateis; por outro lado, WITKOWSKI, THAXTON (1980) observaram em codornizes, que o citoplasma apresentava vacúolos entre os grânulos.

Considerando-se que os grânulos citoplasmáticos dos heterófilos, célula também conhecida como pseudo-eosinófilo, e dos eosinófilos em todas as espécies de aves, assim como nos répteis, apresentam a mesma propriedade tintorial, o melhor critério para distinguir o heterófilo do eosinófilo é aquele que se baseia na forma dos grânulos respectivos de cada tipo de célula (MAXWELL & ROBERTSON, 1998).

O basófilo é um tipo de célula raramente encontrada no sangue circulante de *Buteo magnirostris*, fato esse também observado em outras espécies de aves por ZINSMEISTER, 1988 e CANFIELD, 1998.

Os granulócitos basófilos deste animal apresentam forma esférica, núcleo volumoso esférico central ou excêntrico, de cromatina frouxa com nucléolos visíveis. O citoplasma apresenta grânulos basófilos numerosos, que se dispõem muitas vezes sob forma cordonal na periferia da célula ou isoladamente sobre o

núcleo obscurecendo parcialmente a sua morfologia, aspectos clássicos observados em outras espécies de aves e descritos por MAXWELL & TREJO (1970), HAWKEY et al. (1983), ZINSMEISTER (1988) e CANFIELD (1998). No *Buteo magnirostris*, pode se observar alguns basófilos degranulados, outros com grânulos margeando o núcleo, conforme também observado por ATWAL & McFARLAND (1966) em *Coturnix coturnix japonica* e HAWKEY et al. (1983) em *Grus japonensis* e *Balearica sp.*

Considerando-se a característica dos grânulos citoplasmáticos do *Buteo magnirostris*, como a metacromasia pelo corante azul de metileno e levando-se em conta a participação deste tipo de célula na reação de hipersensibilidade do tipo IV em *Gallus sp.* como relatado por CARLSON & ALLEN, 1969, acredita-se que esta célula, à semelhança do mastócito, possa nesse animal estar relacionado também ao fenômeno alérgico.

Em relação aos leucócitos agranulócitos, no *Buteo magnirostris*, os monócitos se apresentam esféricos, com núcleo vesiculoso em forma de rim e nucléolos evidentes; o citoplasma se apresenta uniforme e fortemente basófilo, ainda mais intensa na periferia da célula, contendo grânulos azurófilos muito finos e vacúolos intracitoplasmática em toda sua extensão. Os nossos resultados correspondem aos encontrados por ATWAL & McFARLAND (1966) em *Coturnix coturnix japonica*, por HODGER (1977) em *Gallus gallus domesticus*, por HAWKEY, et al. (1982) em *Psittacus erithacus*, por HAWKER, et al. (1983) em várias espécies de *Gruiformes* e finalmente por HAWKER, et al (1984) em *Phoenicopterus ruber ruber*, cuja a função é compatível com aquela de defesa, apresentando características inerentes as células com capacidade fagocítica. Sabe-se que os monócitos de aves, à semelhança dos de mamíferos, exercem atividade oxidativa sendo capaz de produzir compostos de nitrogênio altamente reativos (LATIMER, 2000).

Quanto aos linfócitos de *Buteo magnirostris*, pode se observar três tipos morfológicamente distintos: linfócitos de tamanho pequeno, com núcleo esférico, cromatina condensada e citoplasma escasso, mostrando as vezes inúmeras projeções citoplasmáticas e com grânulos azurófilos de localização justanuclear, semelhantes àqueles descritos por RITCHIE, HARRISON, HARRISON (1994) em aves domésticas. Os linfócitos de tamanho médio, representa o segundo tipo mais comum no sangue circulante, sendo tipicamente esféricos, com núcleo esférico de localização excêntrica, ocasionalmente indentado, com cromatina em grumos e citoplasma basófilo escasso com presença de grânulos azurófilos. Este tipo de leucócito por nós identificado como linfócito médio, possivelmente, corresponde ao linfócito intermediário, assim denominado por LUCAS & JAMAROSZ (1961), HODGES (1977), CAMPBELL & DEIN (1984) e célula intermediária por SWAYNE, STOCKHAM, JOHNSON, (1986). O linfócito grande é o tipo menos freqüente no sangue periférico deste animal, apresentando com freqüência forma esférica, núcleo reniforme e cromatina frouxa mostrando amplas projeções citoplasmáticas. As descrições referentes aos linfócitos são também semelhantes àqueles relatados por ATWAL & McFARLAND (1966) em *Coturnix coturnix japonica*, estudado por HAWKEY, et al. (1982) em *Psittacus erithacus* e por HAWKER, et al. (1983) em várias espécies de *Gruiformes*.

Dentre os linfócitos encontrados no *Buteo magnirostris*, principalmente aqueles pequenos e esféricos podem ser facilmente confundido com os trombócitos pequenos e com o mesmo aspecto morfológico ocasionalmente observados na corrente sangüínea. Semelhantemente, outros autores como JANZARIK & MORGENSTERN, 1979; ROSSKOPF & WOERPEL, 1983 relataram também semelhanças entre os linfócitos pequenos e trombócitos não só em aves, mas também em répteis, anfíbios e peixes (STOKIES & FIRKIN, 1971; MOURA, 1996 e VEIGA, 1999).

Para a caracterização citoquímica das células sangüíneas de *Buteo magnirostris*, foram aplicados métodos para detecção de quatro tipos de macromoléculas de natureza química diferente, tais como: o glicogênio, enzimas lisossômicas (mieloperoxidase e a fosfatase ácida), proteínas ricas em poliaminoácidos básicos e fosfolipídios.

Para a demonstração do glicogênio, foi aplicado o método do ácido-periódico-Schiff (PAS) segundo (Mc MANUS, 1946), com controle de especificidade pela amilase salivar (LISON, 1960), método rápido, eficaz, universalmente aceito e extensivamente utilizado no sangue periférico de aves e de outros vertebrados por diversos autores (MERKAL & MORA 1962; MAXWELL & TREJO, 1970; MAXWELL, 1973; CAXTON-MARTINS & DAIMON, 1976; EGAMI & SASSO, 1991, MOURA, W.L, MATUSHIMA, E.R., OLIVEIRA, L.W., & EGAMI, M.I.,1999; VEIGA, 1999 e PACHECO, 2000; UEDA, 2001).

Por esse método foi constatado no *Buteo magnirostris*, a presença de glicogênio sob forma de precipitado de cor magenta no citoplasma dos trombócitos, heterófilos e eosinófilos.

Em relação aos trombócitos, resultado positivo também foi observado por MERKAL & MORA (1962) em *Gallus sp.* da variedade leghorn e por ATWAL & McFARLAND (1966) em *Coturnix coturnix japonica*, por SRIRAMAN et al. (1981) em patos e *Gallus sp.* da variedade leghorn, por SWAYNE, STOCKHAM, JOHNSON (1986) em *Gallus sp.* e por EGAMI & SASSO (1991), pesquisando *Gallus domesticus*. Por outro lado, outros autores como CAXTON-MARTINS & DAIMON, (1976), pesquisando *Gallus domesticus* não observaram a presença de glicogênio no citoplasma destas células.

Quanto à positividade desta substância nos heterófilos esta se apresentou com maior intensidade na região periférica do citoplasma, tal qual observados também por CAXTON-MARTINS & DAIMON, (1976) e EGAMI & SASSO (1991) em *Gallus domesticus*.

Quanto a presença de glicogênio nos eosinófilos, os nossos resultados estão de acordo com os de SRIRAMAN et al. (1981) em patos e *Gallus sp.* da variedade *leghorn*. Porém, outros autores como CAXTON-MARTINS & DAIMON, (1976), ANDREASEN & LATIMER (1989), ANDREASEN & LATIMER (1990) e EGAMI & SASSO (1991), não observaram reação positiva para glicogênio no citoplasma desta célula.

No que diz respeito à concentração do glicogênio por nós observado no citoplasma dos trombócitos, acreditamos que esta inclusão representa uma reserva energética desta célula, já que alguns autores como CHANG & HAMILTON, 1979; GRECCHI, SALIBA & MARIANO 1980; TAFFAREL & OLIVEIRA, 1992; DaMATTA et al., 1998b relatam que estas células encontram-se envolvidas em processos hemostático, fagocítico, endocítico e inflamatório, todos realizados com consumo energético.

Quanto à presença do glicogênio nos heterófilos e eosinófilos é admitido que este polissacarídeo esteja intimamente relacionado aos movimentos amebóides e a sua capacidade fagocítica, uma vez que estes processos são dependentes de glicólise anaeróbica com consumo extracelular de glicose e de glicogênio endógeno (EGAMI & SASSO, 1988; EGAMI & SASSO, 1991; UEDA, 2001).

Em relação à presença de glicogênio em heterófilos e eosinófilos, os autores referem que a proliferação e a maturação dos granulócitos na medula óssea é um processo que requer elevada dependência energética, de modo que quando estas

células atingirem o estágio máximo de maturação, estariam com a quantidade reduzida de glicogênio no citoplasma (MERKAL & MORA, 1962 e CAXTON-MARTIN & DAIMON, 1976).

Em relação à detecção de proteínas, optamos em utilizar o do método Sírius Red para a detecção daquelas ricas em aminoácidos de caráter básico no sangue periférico de *Buteo magnirostris*, por ser um método sensível, como recomendado também por KELÉNY & NÉMETH (1969), BOGOMOLETZ (1980) e PACHECO (2000).

Após a aplicação do método Sírius Red, foi possível observar no nosso material, positividade para os trombócitos, os leucócitos granulócitos heterófilos e eosinófilos. Nos trombócitos foi demonstrada positividade para proteínas básicas visível em apenas um único e volumoso grânulo citoplasmático. Nos heterófilos, os grânulos se apresentaram claramente delineados, mostrando uma forte positividade, como relatado por MERKAL & MORA (1962). Os heterófilos em geral, mostram uma reação positiva mais intensa em relação aos eosinófilos. Por outro lado, KELÉNY & NÉMETH (1969) em *Gallus domesticus* e *Columba domestica* não conseguiram diferenciar os heterófilos dos eosinófilos mesmo após a aplicação do método Sírius Red. Já EGAMI & SASSO (1991) em *Gallus domesticus* observaram uma variação na intensidade da reação para proteínas em geral nos grânulos fusiformes dos heterófilos.

EVANS et al. em 1994, isolaram em heterófilos de aves cinco peptídeos catiônicos com atividade antibacteriana, confirmando a presença da arginina, cisteína e lisina nos grânulos deste tipo de célula.

Hoje sabe-se que as substâncias catiônicas acima referidas encontram-se envolvidas, pelo menos em mamíferos, na defesa do organismo contra infecção de

ordem bactericida, por parasitas ou por helmintos (ROBBINS, 1996). Considerando-se portando que os poliaminoácidos básicos representam as proteínas catiônicas encontradas em eosinófilos e heterófilos do animal em estudo, as mesmas poderiam estar relacionadas com os mesmos processos de defesa.

No que se refere à detecção da mieloperoxidase, ao microscópio de luz, nas células sangüíneas de *Buteo magnirostris*, foi utilizado o método de JACOBS (1958), por ser altamente específico, não carcinogênico e de elevada sensibilidade na detecção da mieloperoxidase, e por ser extensivamente utilizado no sangue periférico tanto de aves quanto de outros vertebrados por diversos autores como CAXTON-MARTINS & DAIMON (1976) no sangue periférico e na medula de *Gallus domesticus* da variedade *leghorn*, SASSO & EGAMI (1986) em *Bufo ictericus*, EGAMI & SASSO (1988) em *Bothrops jararaca*, EGAMI & SASSO (1991) em *Gallus domesticus*, ARAÚJO (1994) em *Metachirus nudicaudatus*, MOURA et al. (1998) em *Caiman crocodilus yacare*, VEIGA, (1999) em *Salminus maxillosus* e UEDA (2001) em *Oreochromis niloticus*.

A mieloperoxidase é uma enzima lisossômica de ação bactericida de grande importância em células de ação fagocítica, pois esta é uma enzima de ação hidrolítica presente nos grânulos citoplasmáticos de determinados tipos de leucócitos, que catalisa a oxidação de íons haletos, para a formação de íons hipohaletos, na presença de peróxido de hidrogênio, resultando na halogenação da parede bacteriana e como consequência a sua destruição. Esta enzima é encontrada em geral, nos grânulos inespecíficos dos neutrófilos, bem como nos específicos dos eosinófilos, nos mamíferos, permitindo a identificação destes tipos de grânulos nestas células (BRETON-GORIUS, 1980). Já em aves as células correspondentes aos neutrófilos, isto é, os heterófilos se mostram negativos para esta enzima no animal em estudo, fato esse já referido por diversos autores KELÉNYI & NÉMETH, (1969); BRUNE & SPITZNAGEL, (1973); RUSCH & MOORE,

(1975); DAIMON & CAXTON-MARTINS, (1977); SRIRAMN, (1981); MAXWELL, (1984a,b); ANDREASEN & LATIMER, (1990), EGAMI & SASSO, (1991) e MERRILL et al. (1996). Por outro lado, esta enzima foi detectada nos eosinófilos de *Buteo magnirostris*.

Frente aos resultados referidos acima, quanto à falta de atividade da mieloperoxidase nos grânulos dos heterófilos de modo geral em aves, bem como em *Buteo magnirostris*, considerando-se que nos grânulos desta mesma célula foi observada uma reação fortemente positiva para poliaminoácidos básicas e lembrando que MacRAE & SPITZNAGEL (1975), MacRAE & POWELL (1979) e EVANS et al. (1994) confirmaram a presença de peptídeos catiônicos envolvidos em atividades fagocíticas, é possível acreditar que a deficiência da mieloperoxidase possa ser substituída pela presença de poliaminoácidos básicos nos grânulos dos heterófilos de *Buteo magnirostris* na realização de atividade fagocítica e atuar como bactericida.

Com relação à função da peroxidase nos eosinófilos foi descrita por MAXWELL (1986b) em *Coturnix coturnix japonica* como uma potente toxina para parasitose, sendo também um eficaz helmitotóxico. Considerando-se que a mieloperoxidase é um tipo de enzima que admite ter sido conservada ao longo da filogênese é possível acreditar que a mesma desempenhe funções equivalentes também em aves.

Para a detecção da atividade da fosfatase ácida ao microscópio de luz, utilizamos o método de BARKA & ANDERSON (1962) por fornecer um resultado preciso e específico e por ser extensivamente utilizado em aves numerosos autores como TOOP & CARLSON (1972), NAIR (1973).

Os nossos resultados para a identificação da fosfatase ácida ao microscopia de luz, demonstraram reação positiva nos trombócitos, heterófilos e linfócitos. Em relação aos trombócitos a positividade foi fraca, tendo sido observada de forma difusa na região perinuclear e em heterófilos, restringindo-se apenas a alguns grânulos esféricos localizados na região do centróssomo. Os linfócitos apresentaram reação positiva nos grânulos distribuídos no citoplasma da célula, também observado por SRIRAMAN et al. (1981) em *Gallus sp.* e em patos e por ANDREASEN & LATIMER (1990) em *Gallus sp.*

Em relação à presença de fosfatase ácida nos grânulos dos heterófilos de *Buteo magnirostris* é também relatada em várias espécies de aves por CAXTON-MARTINS & DAIMON (1976), DAIMON & CAXTON-MARTINS (1977) deixam evidências de que dos grânulos presentes no citoplasma dos heterófilos das aves apenas alguns possuem a fosfatase ácida.

Para a demonstração de substância de natureza lipídica em células sangüíneas, foi utilizado o método Sudan Black B (LISON, 1960) de aceitação universal, pela sensibilidade em evidenciar tanto os fosfolipídios do sistema de membrana quanto os lipídios intracelulares, por propiciar resultados seguros e reprodutíveis por se tratar de um método tradicionalmente empregado com sucesso por outros pesquisadores em células sangüíneas de diversas classes de vertebrados (OLIVEIRA, MOURA, MATUSHIMA, & EGAMI, 1998 (b); MOURA, MATUSHIMA, OLIVEIRA & EGAMI, 1999 e VEIGA, 1999)

Após a aplicação do método Sudan Black B, somente os eosinófilos apresentaram nítida positividade em seus grânulos, possibilitando visibilizar grânulos escuros esféricos compactado distribuídos em todo citoplasma, semelhantes aos observados por MAXWELL (1984a), ANDREASEN & LATIMER (1989), ANDREASEN & LATIMER (1990) e EGAMI & SASSO (1991). Diferente dos nossos resultados SRIRAMAN et al. (1981) observaram

positividade nos grânulos de alguns monócitos e EGAMI & SASSO (1991) observaram poucos grânulos sudanofílicos em heterófilos preferencialmente distribuídos na periferia da célula.

Segundo MAXWELL (1986b) e STELMASZYNSKA et al. (1992), considerando-se a presença da mieloperoxidase e de substância de natureza lipídica nos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos de aves, referem o fato de que esta inclusão na presença da mieloperoxidase poderá sofrer oxidação levando à formação de uma potente toxina helmintotóxica para o combate de parasitas. Diante desse fato e considerando-se a presença da mieloperoxidase nos grânulos citoplasmáticos de eosinófilos do animal em estudo acreditamos poder admitir que possa ocorrer interação entre esta enzima e a inclusão lipídica também nesta espécie de ave.

Passaremos a seguir à discussão dos resultados ultra-estruturais dos trombócitos e granulócitos.

Para o estudo destas células ao microscópio eletrônico de transmissão, as amostras do sangue periférico do animal foram colocadas em tubos com EDTA, centrifugado (ANDERSON, 1965) e prontamente fixadas em uma mistura de glutaraldeído e paraformaldeído (KARNOVSKY, 1965) por se tratar de uma mistura fixadora tradicionalmente empregada com sucesso por outros pesquisadores na fixação das células sangüíneas (OLIVEIRA, MOURA, MATUSHIMA, & EGAMI, 1998; MOURA, MATUSHIMA, OLIVEIRA & EGAMI, 1999; VEIGA, 1999 e PACHECO, 2000).

Ultra-estruturalmente foram reconhecidos duas formas distintas de trombócitos: elíptica e esférica, semelhantes àquelas encontradas por MAXWELL & TREJO (1970) e NIRMALAN, ATWAL & CARLSON (1972) e por outro lado

outros pesquisadores como SIMPSON (1967) e SWEENY & CARLSON (1968) relataram apenas um tipo de trombócito e em geral da forma elíptica. A forma elíptica é em geral menor, com núcleo elíptico parcialmente heterocromático. Os trombócitos esféricos são maiores, com núcleo predominantemente eucromático. Ambos os tipos apresentam características citoplasmáticas semelhantes. No citoplasma chama a atenção a presença de vacúolos elétron-lúcidos ora contendo grânulos elétron-densos localizados na periferia dos mesmos, ora apresentando várias estruturas de membranas isoladas ou fundidas e dispostas concentricamente formando lamelas. Ocasionalmente eram observados também vacúolos contendo material amorfo elétron-opaco, semelhantes àqueles observados por DAIMON, UCHIDA, MIZUHIRA (1977), DAIMON & UCHIDA (1978) e PELLIZON (1996).

Considerando-se que os trombócitos são células relatadas como envolvidas em processos fagocítico e endocítico (TAFFAREL & OLIVEIRA, 1992; DaMATTA et al., 1998a), é possível admitir que os vacúolos estariam relacionados ao processo de digestão do material fagocitado, seguido de degeneração, como relatado por SIMPSON (1968) em trombócitos de *Meleagris gallopavo*. Foram observadas ainda, distribuídas no citoplasma dos trombócitos em *Buteo magnirostris*, mitocôndrias com matriz elétron-densa, retículo endoplasmático, feixes marginais de microtúbulos, um sistema de túbulos, vesículas derivadas de invaginações de membrana e um sistema de canais abertos ligados à superfície. Nossos achados são semelhantes aos de MAXWELL & TREJO (1970) que descreveram em trombócitos de aves domésticas e DAIMON & UCHIDA (1978) em *Gallus sp.*

No que diz respeito aos granulócitos do sangue periférico de *Buteo magnirostris*, ao microscópio eletrônico de transmissão foram observados três tipos: heterófilo, eosinófilo e basófilo.

Os heterófilos de *Buteo magnirostris*, se apresentam esféricos com pequenas projeções citoplasmáticas, núcleo lobulado projetado para a periferia celular. O citoplasma apresenta três tipos de grânulos: um deles, elétron-denso, extremamente volumoso abaulado com extremidade delgada afilada, de aspecto oval ou em forma de gota. Observa-se ainda grânulos muito pequenos em forma de bastão e em halteres, sendo a principal característica destes últimos a presença de um material elétron-denso filamentoso no interior da matriz. O terceiro tipo se caracteriza por serem esféricos, elétron-densos e por serem menores em relação aos demais tipos já referidos. Esses resultados foram também observados por MacRAE & POWEL (1979) que nomearam os grânulos com características semelhantes como A, B e C respectivamente, forma semelhante foram também observados por DHINGRA et al. 1969 em *Gallus domesticus*, ERICSSON & NAIR 1973 em *Gallus sp.*, MAXWELL (1973) em *Ana platyrhynchos*, *Anser anser*, *Meleagris gallopavo* e *Columba livia*, DAIMON & CAXTON-MARTINS 1977 em *Gallus sp.* da variedade *leghorn*. NIRMALAN, ATWAL & CARLSON (1972) sugerem que esta variação quanto ao tamanho, forma e elétron densidade esteja relacionada com as fases de maturação dos grânulos.

No que diz respeito ao esinófilo de *Buteo magnirostris*, este apresenta núcleo lobulado com heterocromatina associada à porção interna do envelope nuclear e eucromatina predominantemente na região central. O citoplasma se apresenta com numerosos grânulos esféricos, com pequena variação quanto ao tamanho e elétron densidade. DHINGRA et al. (1969) relataram em *Gallus domesticus*, grânulos de média densidade, MAXWELL & TREJO, (1970) em *Gallus, sp.* observaram grânulos de alta elétron-densidade. Em nossos estudos, ambos os tipos foram encontrados. GHADIALLY (1982) sugere que as diferenças na elétron densidade nos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos reflete a presença de lipídios saturado e insaturado, isto é, os grânulos menos elétron-densos apresentariam lipídios saturados e os mais elétron-densos, lipídios insaturados.

O granulócito basófilo, encontrado no sangue periférico do *Buteo magnirostris*, apresenta forma esférica com pequenas projeções citoplasmáticas, núcleo não lobulado, central, levemente indentado, com nucléolo central; no citoplasma encontra-se três diferentes tipos de grânulos identificados de acordo com a elétron-densidade e o aspecto do padrão granular que constitui o grânulo. O primeiro tipo apresenta-se elétron-denso, podendo alguns destes apresentar regiões elétron-lúcidas bem delimitadas no interior do grânulo; o segundo tipo se apresenta com granulações puntiformes elétron-densas e o terceiro, de aspecto granular fino e menos denso aos elétrons, sendo o tipo mais comum. O segundo tipo de grânulo, é visto frequentemente nos grânulos dos mastócitos em mamíferos, cujo aspecto fora associado ao conteúdo de heparina e histamina por CHEVILLE, 1983. Similar aos nossos resultados MAXWELL, 1973, observou três tipos de grânulos nos basófilos em *Anas platyrhynchos*, *Anser anser*, *Meleagris gallopavo*, *Columba livia*, *Coturnix coturnix japonica* e em *Numida meleagris*. Entretanto, em *Gallus domesticus* este pesquisador observou ainda a presença de um quarto tipo de grânulo mostrando uma disposição concêntrica

Tal qual a observação de MAXWELL & TREJO (1970) sobre a existência de diferentes tipos de grânulos observados em heterófilos e em basófilos, acreditamos que no nosso caso, a variação no aspecto do grânulo estaria em parte relacionada possivelmente ao estágio de maturação dos grânulos.

Em relação às células sanguíneas do *Buteo magnirostris*, se faz necessário ainda um estudo mais aprofundado das mesmas, aplicando-se técnicas que permitam estudar as células vivas para melhor caracterizar funcionalmente os tipos celulares, técnicas imunocitoquímicas para a localização de macromoléculas específicas, métodos citoquímicos ultra-estruturais para identificar e localizar com

maior precisão as substâncias presentes nos grânulos citoplasmáticos dos leucócitos granulócitos e ainda um estudo pormenorizado da granulocitopoese

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo do sangue periférico de *Buteo magnirostris*, permitiram concluir que:

1. Foram identificados estruturalmente, os seguintes elementos figurados: Eritrócitos imaturos e maduros, reticulócitos, trombócitos esféricos e elípticos, heterófilos com grânulos pequenos e grandes, eosinófilos com grânulos basófilos e acidófilos, basófilos, linfócitos pequenos, médios e grandes e monócitos.
2. A forma dos grânulos se revelou o melhor critério para distinguir o eosinófilo do heterófilo.
3. O elemento figurado mais raro é o basófilo.
4. O glicogênio, sob forma de grânulos foi detectado no citoplasma dos trombócitos, heterófilos e eosinófilos; proteínas ricas em poliaminoácidos básicos nos grânulos dos trombócitos, heterófilos e eosinófilos; mieloperoxidase nos grânulos dos eosinófilos; fosfatase ácida nos trombócitos, heterófilos e linfócitos e a presença de substância de natureza lipídica nos grânulos dos eosinófilos.
5. Ultra-estruturalmente foram identificados: dois tipos de trombócitos; heterófilos com três tipos de grânulos citoplasmáticos; eosinófilos com um único tipo de grânulo no citoplasma e basófilos com citoplasma contendo três tipos de grânulos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELEND, M. et al. Blood values of common cranes (*Grus grus*) by age and season. **Comp. Biochem. Physiol.**, 104: 575-578, 1992.
- AGUILAR, R. S. H. – First record of dilute plumage in roadside hawk (*Buteo magnirostris*). **J. Raptor Res.**, **27** (1): 49, 1993.
- ANDERSON, D. R. – A method of preparing peripheral leucocytes for electron microscopy. **J. Ultrastruct. Res.**, **13**: 263-8, 1965.
- ANDREASEN, C.B & LATIMER, K.S. - Separation of avian heterophils from blood using ficoll-hypaque discontinuous gradients. **Avian Dis.**, **33** (1): 163-167, 1989.
- ANDREASEN, C. B. & LATIMER, K. S. – Cytochemical staining characteristics of chicken heterophils and eosiphils. **Vet. Clin. Path.**, **19** (2): 51-54, 1990.
- ARAÚJO, A.S.C. - **Aspectos morfológicos e citoquímicos de leucócitos, ultra-estruturais de neutrófilos e eosinófilos, do sangue periférico do marsupial *Metachirus nudicaudatus* GEOFFROY, 1803.** São Paulo 1994. [Tese Mestrado - Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de medicina].
- ARCHER, R.K. – **Técnicas hematologia animal.** Ácribia Zaragoza. Espanã, 1967.
- ATWAL O.S & MCFARLAN, L.Z. Phologic and cytochemical study of erythrocytes and leukocytes of *Coturnix coturnix japonica*. **Am. J. Vet. Res.** **27** (119): 1059, 1966.

- BARKA, T. & ANDERSON, T.J. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as couple. **J. Histochem. Cytochem.** **10**: 741, 1962.
- BELTZER, A.H. – Biología alimentaria del gavilán común *Buteo magnirostris saturatus* (Ave: Accipitridae) en el valle aluvial del río Paraná medio, Argentina. **Ornitol. Neotrop.**, **1** (1-2): 3-8, 1990.
- BERTRAM, E.M. – Characterisation of duck thrombocytes. **Res. Vet. Sci.** **64**: 267-270, 1998.
- BOGOMOLETZ, W. – Coloration del amyloide et des éosinophiles. **Arch. Anat. Cytol. Pathol.**, **28** (4): 253-4, 1980.
- BOUNOUS, D.I. & STEDMAN, N.L. – Normal avian hematology: chicken and turkey. In: FELDMAN, B.V.; ZINKL, J.G. & JAIN, N.C. – **SCHALM'S Veterinary hematology**. 5 ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000. P.1145-1154.
- BOWERMAN, W.W; STICKLE, J.E & GIESY, J.P. Hematology and serum chemistries of nestling bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) in the lower peninsula of MI, USA. **Chemosphere**, **41**(10):1575-1579, 2000.
- BRETON-GORIUS, J. The value of cytochemical peroxidase reactions at the ultrastructural level in haematology. **Histochem. J.**, **12**: 127-137, 1980.
- BROOKS, R.L; BOUNOUS, D.I. & ANDREASEN, C.B. - Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. **Comp. Haematol. Int.**, **6** (3): 153-159, 1996.

BRUNE, K. & SPITZNAGEL, J.K. – Peroxidaseless chicken leukocytes: Isolation and characterization of antibacterial granules. **J. Infec. Dis.**, **127** (1): 86-94, 1973.

CAMPBELL, T. W. – **Avian hematology and cytology**. Iowa, Iowa State Univeristy Press, 2 ed., 1995, p. 118.

CAMPBELL, T.W. – Hematology. In: RICHIE, B. W; HARRISON, G. L.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: Principles and Applications**. Winger Publishing, 1994, p.176-198.

CAMPBELL, T.W. – Normal hematology of Psittacines. In: FELDMAN, B.V.; ZINKL, J.G. & JAIN, N.C. – **SCHALM'S Veterinary hematology**. 5 ed. Philadelphia, lippincott Williams e Wilkins, 2000. P. 1155-11560.

CAMPBELL, T.W. – Tropical fish medicine. Fish cytology and hematology. **Vet. Clin. North. Am. Amall Anim. Pract.**, **18** (2): 349-364, 1988.

CAMPBELL, T.W. & DEIN, F. J. – Avian hematology: The Basic. **Vet. Clin. North. Am. Amall Anim. Pract.**, **14**: 223-248, 1984.

CANFIELD, P.J. - Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. **Aust. Vet. J.** **76** (12):793-800, 1998.

CARLSON, H.C. & ALLEN, J.R. - Acute inflammatory reaction in chicken skin - blood cellular response. **Avian Dis** **13** (4): 817-& 1969

CAXTON-MARTINS, A.E. & DAIMON, T. – Histochemical observations on chicken blood and bone marrow cells. **J. Anat.** **123** (3): 553-558, 1976.

CHANG, C. & HAMILTON, P.B. – The thrombocyte as the primary circulating phagocyte in chickens. **J. Reticuloendothe. Soc.**, **25**: 585-590, 1979.

CLUBB, S.L. et al. - Hematologic and serum biochemical reference intervals in juvenile cockatoos. **J. Assoc. Avian Vet.** **5**(1): 16-26, 1991.

DABERT, J. & EHRNSBERGER, R. – Neue arten bei der Federmilbenfamilie Ascouracarudae Gaud & Atyeo, 1976. **Osnabruecker Naturwisswnschaftkiche Mitteilungen**, **18**: 109-150, 1992.

DAIMON, T. & CAXTON-MARTINS, A. - Electron-microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leukocytes. **J. Anat.**, **123**: 553-562, 1977.

DAIMON, T & UCHIDA, K. – Electron microscopic and cytochemical observations on the membrane systems of the chicken thrombocyte. **J. Anat.** **125** (1): 11-21, 1978.

DAIMON, T.; UCHIDA, K. & MIZUHIRA, V. – Ultrastructural localization of acid protein polysaccharides and calcium in the vacuoles of the chicken thrombocyte. **Histochem.** , **52**: 25-32, 1977.

DaMATTA, R.A. et al. – Chicken thrombocytes in culture: lymphocyte-conditioned medium delays apoptosis. **Tissue & Cell**, **31** (3): 255-263, 1998a.

DaMATTA, R.A. et al. – Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. **Biol. cell**, **22**:45-52, 1998b.

- DaMATTA, R.A. et al. – Chicken thrombocytes in culture: lymphocyte-conditioned medium delays apoptosis. **Tissue & Cell**, **31** (3): 255-263, 1999.
- DEIN, F.J. – Laboratory manual of avian hematology. **Assoc. Avian Vet., East Northport**, 1984.
- DEIN, F. J., WILSON, A., FICHER, D. & LANFENBERG, P. – Avian leucocyte counting using the hemocytometer. **J. Zoo. Wildl. Med.**, **25** (3): 432-437, 1994.
- DHINGRA, L. D.; PARRISH, W.B. & VENSKEIN, W.G. – Electron microscopy of granular leukocytes of chicken (*Gallus domesticus*). **Am. Res. J. Vet.**, **30**: 637-42, 1969.
- DONALDSON, G.M.; SHUTT, J.L.; HUNTER, P. Organochlorine contamination in bald eagle eggs and nestlings from the Canadian Great Lakes. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **36** (1):70-80, 1999.
- EGAMI, M.I. & SASSO, W.S. - Cytochemical observations of blood cells of *Bothrops jararaca* (Reptilia, Squamata). **Rev. Bras. Biol.**, **48**(2): 155-159, 1988.
- EGAMI, M.I. & SASSO, W.S. - Topochemistry of blood cells of the *Gallus domesticus* (Aves, Galliforme). **Rev. Bras. Biol.**, **51**(1): 211-214, 1991.
- ELLIOT, J. E. & SHUTT, L. – Monitoring organochlorines in blood of sharp-shinned hawks (*Accipiter striatus*) migrating through the Great Lakes. **Environ. Toxicol. Chem.**, **12**(2): 241-250, 1993.

ERICSSON, J.L. & NAIR, M.K. Electron-microscopic demonstration of acid-phosphatase activity in developing and mature heterophils of chicken. **Histochem.**, **37**(2): 97-105, 1973.

EVANS, E.W. et al. – Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. **J. Leuk. Biol.** **56**: 661-686, 1994.

FERNIE, K.J. & BIRD, D.M. Evidence of oxidative stress in American kestrels exposed to electromagnetic fields. **Environ. Res.**, **86**(2):198-207, 2001.

FORRESTER, D. T. – Blood parasites of raptor in Florida. **J. Raptor Res.**, **28**(4): 226-231, 1994.

FOURIE, F.L.R. & HATTINGH, J. – Comparative hematology of some South African birds. **Comp. Biochem. Physiol.** **74**: 443, 1983.

GACHTGENS, P.; SCHMIDT, F.; WILL, G. – Comparative rheology of nucleated and non-nucleated red blood cells. 1. Microrheology of avian erythrocytes during capillary flow. **Pflügers Arch.**, **390**: 283, 1981.

GHADIALLY, F.N. – **Ultrastructural pathology of the cell and matrix.** London, Butterworths, 1982. p.280, 316, 716.

GRECCHI, R.; SALIBA, A.M. & MARIANO, M. – Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mono-nuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. **J. Pathol.** **130**: 23-31, 1980.

HARRISON, G.L. - **Using and Interpreting a fecal Gram's Stain.** HBD, Lake Worth, Florida, 1992.

HARRISON, G.L. & HARRISON, R. L. **Clinical Avian Medicine and Surgery**. Philadelphia, WB Saunders, 1988.

HARTMAN, F.A. & LESSLER, M.A. Erythrocyte measurements in birds. **Auk**. **80**: 477, 1963.

HAWKEY, C.M. et al. Haematological findings in healthy and sick African grey parrots (*Psittacus erithacus*). **Vet. Rec.** 111: 580-582, 1982.

HAWKEY, C.M. et al. - Normal and clinical hematology of captive cranes (Gruiformes). **Avian Pathol.**, **12**(1): 73-84, 1983.

HAWKEY, C.M. et al. Haematological findings in healthy and sick captive rosy flamingos (*Phoenicopterus ruber ruber*). **Avian Pathol.** **13**: 163-172, 1984.

HAWKEY, C. M.; SAMOUR, H.J.; JACOBSON, E. R. & KOLLIAS Jr. – **The value of clinical hematology in exotic birds**. Exotic Animal. New York, Churchill Livingstone, 1988, p. 109-141.

HODGER, D.R. – Normal avian (poultry) haematology. In: ARCHER, R.K. & JEFFCOTT, L.B. **Comparative clinical haematology**. London, Blackwell Scientific Publications, 1977. P. 483-517.

JACOBS, A. – **Staining for leucocyte peroxidase**. Lancet V.1, 1958. p. 697.

JANZARIK, H. – Nucleo thrombocytoid cells. II. Phase and interference contrast microscopic studies on blood cells of the domestic fowl. **Cell Tissue Res.** **219** (3): 497-510, 1981.

JANZARIK, H. & MORGENSTERN, E. - Núcleo thrombocytoid cells. I. Electron microscopic studies on chicken blood cells. **Thromb. Haemostas.** **41**: 608-621, 1979.

JOHNSON-DELANEY, C.A. - **Exotic companion medicine handbook for veterinarians**. Wingers, Lake Worth, FL, 1996, pp 11-16.

JOYNER, H. L.; DUARTE, J. P. S. & KORNELSEN, M. J. – Hematology and serum values in captive juvenile yellow-naped Amazons (*Amazona auropalliata*). In JOYNER, H. L.; DUARTE, J. P. S. & KORNELSEN, M. J. **Main Conferenc Proceedings Association of Avian Veterinarians**. Nevad, 1994, p. 185-188.

KARNOVSKY, M.J. – A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolabilidade for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, **27**: 137-8, 1965.

KELÉNYI, G. & NÉMETH, Á. – Comparative histochemistry and electron microscopy of the eosinophil leucocytes of vertebrates. **Acta Biol. Acad. Sci. Hung.**, **20** (4): 405-422, 1969.

LANZAROT, MP; et al. Hematological, protein electrophoresis and cholinesterase values of free-living nestling peregrine falcons in Spain. **J. Wildl. Dis.**, **Jan**; **37**(1):172-177, 2001.

LATIMER, K.S. et al. - Leukocyte changes associated with acute-inflammation in chickens. **Avian Dis.**, **32** (4): 760-772, 1988.

LATIMER, K.S. & DOROTHEE BIENZE. In : FELDMAN, B.V.; ZINKL, J.G. & JAIN, N.C. – **SCHALM'S Veterinary hematology**. 5 ed. Philadelphia, lippincott Williams e Wilkins, 2000. p.427-428.

LEAL, L.O.P. **Produção industrial do frango de corte**. Brasileira de Agricultura, São Paulo 1971. p. 7-9.

LEWIS, J.H.; HASIBA, U. & SPERO, J.A. - Comparative hematology - studies on class aves, domestic turkey (*meleagris-gallopavo*). **Comp Bioch. Physiol.** **62**(3): 735-745, 1979.

LISON, L. – Lipides et lipoproteines. In: LISON, L. – **Histochimie et cytochimie animales. Principes et methodes**. Paris, Gauthier- Villares V. 2, 1960, p. 449-530.

LUCAS, A.J. & JAMROZ C. – Atlas of avian hematology. **Agriculture monograph 25**: 41-46, 1961.

MacRAE, E.K. & SPITZNAGEL, J.K. – Ultrastructural localization of cationic proteins in cytoplasmic granules of chicken and rabbit polymorphonuclear leukocytes. **J. Cell Sci.**, **17**: 79-94, 1975.

MacRAE, E.K & POWELL, R.E. Cytochemical reaction for cationic proteins as a marker of primary granules during development in chick heterophils. **Histochem.**, **60** (3): 295-308, 1979.

MAXWELL, M.H. - Fine-structure of granules in eosinophil leukocytes from aquatic and terrestrial birds. **Tissue & cell** **10**(2): 303-317 1978

MAXWELL, M.H. - Histochemical identification of tissue eosinophils in the inflammatory response of the fowl (*Gallus-domesticus*). **Res. Vet. Sci.**, **37**(1): 7-11, 1984a.

MAXWELL, M.H. - The distribution and localization of acid trimetaphosphatase in developing heterophils and eosinophils in the bone-marrow of the fowl and the duck. **Cell and Tissue Res.**, **235**(1): 171-176 1984b.

MAXWELL, M.H & ROBERTSON, G.W. - The avian heterophil leucocyte: a review. **World Poultry Sci. J.**, **54** (2): 155-178, 1998.

MAXWELL, M.H; ROBERTSON, G.W, SPENCE, S. & McCORQUODALE, C.C. – Comparison of haematological values in restricted and libitum-fed domestic fowel: white blood cells and thrombocytes. **Br. Poultry Sci.**, **31**: 399-405, 1990.

MAXWELL MH. The avian eosinophil - A review. **World Poultry Sci. J.** **43** (3): 190-207, 1987.

MAXWELL, M.H. – Fine-ultrastructural and cytochemical studies of eosinophils from fowls and ducks with eosinophilia. **Res. Vet. Sci.** **41**: 135-148, 1986a.

MAXWELL MH. Ultrastructural and cytochemical studies in normal japanese-quail (*Coturnix-coturnix-japonica*) eosinophils and in those from birds with experimentally induced eosinophilia. **Res. Vet. Sci.** **41** (2): 149-161, 1986b.

- MAXWELL, M.A. – Comparison of heterophil and basophil ultrastructure in six species of domestic birds. **J. Anat.**, **115** (2): 187-202, 1973.
- MAXWELL, M.A. & ROBERTSON, G.W. – The avian basophilic leucocyte: a review. **World's Poultry Sci. J.**, **51**: 307-318, 1995.
- MAXWELL, M.A. & SILLER W.G. – The ultrastructural characteristics of the eosinophil granules in six species of domestic bird. **J. Anat.**, **112** (2): 289-302, 1972.
- MAXWELL, M.A. & TREJO, F. – The ultrastructure of white blood cells and thrombocytes of the domestic fowl. **Br. Vet. J.**, **126**: 583, 1970.
- MAXWELL, M.A.- Avian blood leucocyte responses to stress. **World's Poultry Sci. J.**, **43** (1): 34-43, 1991.
- McMANUS, J.F.A. – Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, **158**: 202, 1946.
- MERKAL, R.S. & MORA, E.C. – Cytochemistry of erythrocytes and leukocytes of the white leghorn chicken. **Exp. Mol. Path.**, **1**: 497-508, 1962.
- MERRILL, G.A. et al. - Oxygenation activities of chicken polymorphonuclear leukocytes investigated by selective chemiluminogenic probes. **Lab. Anim. Sci.**, **46** (5): 530-538, 1996.
- MILLS, J.N. & WILCOX, G.E. - Separation of phagocytic leukocytes from the peripheral-blood of chickens. **Avian Pathol.**, **22** (2): 343-352 1993

- MOCKEL, R. & GUNTHER, D. – The reproduction of the sparrow-hawk *Accipiter nisus* in the Westerzgerbirge in the years 1974 to 1989. In: MOCKEL, R. & GUNTHER, D. **Population ecologica of raptor and owls**. V. 2, 1991. p. 317-332.
- MONTALI, R.J. - Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **J. Comp. Pathol.**, **99**(1): 1-26, 1988.
- MOURA, W.L.; OLIVEIRA, L.W. & EGAMI, M.I. - Aspectos ultraestruturales de trombócitos y heterófilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Rev. Chil. Anat.**, **13**(2): 201-208, 1998.
- MOURA, W.L. - **Aspectos morfológicos, citoquímicos e ultra-estrutural dos glóbulos sangüíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia)**. São Paulo, 1996. [Tese Mestrado – Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina].
- MOURA, W.L.; OLIVEIRA, L.W.; MATUSHIMA, E.R. & EGAMI, M.I. - Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sangüíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, **36**(1): aceito para publicação em junho de 1998, 1999 – no prelo.
- NAIR, M.K. - Early inflammatory reaction in fowl - light microscopical, ultrastructural and autoradiographic study. **Acta. Vet. Scand.** **1**. suppl.: 42, 1973.
- NAVARRO, C.E.K.G.; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. Varela, 1994.

- NEWTON, I. & WYLIE, I. – **Recovery of a sparrow hawk population in relation to a decline in pesticide contamination.** Report Institute of Terrestrial Ecology, 1991, p. 46-48.
- NIRMALAN, G.P; ATWAL, O.S. & CARLSON, H.C. - Ultrastructural studies on leukocytes and thrombocytes in circulating blood of japanese-quail. **Poultry Sci.** **51**(6): 2050-2055, 1972.
- OLIVEIRA, L.W.; MOURA, W.L.; MATUSHIMA, E. R. & EGAMI, M.I. – Características citoquímicas morfológicas y ultraestructurales de eosinófilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Rev. Chil. Anat.**, **16** (2): 245-254, 1998 (a).
- OLIVEIRA, L.W.; MOURA, W.L.; MATUSHIMA, E. R. & EGAMI, M.I. – Características citoquímicas morfológicas y ultraestructurales de eosinófilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Rev. Chil. Cs. Méd. Biol.**, **8** (2): 59-65, 1998 (b).
- OSCULATI, F. - Fine structural localization of acid phosphatase and arylsulfatase in chick heterophil leucocyte. **Z. Zellforsch.**, **9** (3): 398-406, 1969.
- OTS, T. & HORAK, P. – Great tits *Parus major* trade health for reproduction. **Proc. Ro. Soc. Biol. Sci.**, **263** (1376): 1443-1447, 1996.
- PACHECO, F.J. – **Observações estruturais e ultra-estruturais de granulócitos do órgão epigonal e de granulócitos e trombócitos do sangue periférico do tubarão *Rhizoprionodon lalandii* (VALENCIENNES, 1839)(ELASMOBRANCHII, CARCHARHINIDAE)** São Paulo, 2000. [Tese – Mestrado – Escola Paulista de Medicina].

PELLIZON, C.H. – **Participação de trombócitos de tartaruga em processos endocíticos. Uma análise ultra-estrutural e citoquímica.** São Paulo, 1996. [Tese – Mestrado – Escola Paulista de Medicina].

PHALEN, D.N.; TAYLOR, C.; PHALEN, S.W. & BENNETT, G.F. – Hemograms and hematozoa of sharp-shinned and captured (*Accipiter striatus*) and Cooper's Hawk (*Accipiter cooperii*) during spring migration in northern New York. **J. Wildl. Dis.**, **31** (2): 216-22, 1995.

POWELL, P.C. – Immune machanisms in infections of poultry. **Vet. Immunol.Immunophatol.** **15**:87-113, 1987a.

POWELL, P. C. – Macrophages and other non-lymphoid cells contributing to immunity. In: TOIVANEN, A. & TOIVANEN, P. **Avian immunology: Basis and practice.** Vol.1. ed. CRC Press, Boca Raton, FL., 1987b, 195-212.

REYNOLDS, E.S. - Use of lead citrate at hight pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, **17**: 208-13, 1963.

RHEINGOLD, J.J. & WISLOCKI, G.B. - Histochemical methods applied to haematology. **Blood**, **3**: 641-55, 1948.

RICHARDSON, K.C.; JARETT, L; FINKE, E.H. - Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. **Stain Technol.**, **35**: 313-23, 1960.

RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J. & HARRISON, L.R.- **Hematology. Avian Medicine: Principles and Application**, 1994.

- ROBERTSON, G.W. & MAXWELL, M.H. - Importance of optimal mixtures of edta anticoagulant - blood for the preparation of well-stained avian blood smears. **Br. Poultry Sci.**, **34** (3): 615-617, 1993.
- ROBERTSON, G.W. & MAXWELL, M.H. - Modified staining techniques for avian blood-cells. **Br. Poultry Sci.**, **31**(4): 881-886, 1990.
- ROBBINS, S.L. et al. – Lesão celular e morte celular. In: ROBBINS, S.L. et al. **Patologia estrutural e funcional**. 5 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996. p. 9-11.
- ROSSKLOPF, W.J. et al. – Hematology and blood chemistry values for common pet avian species. **Vet. Med. Small Anim. Pract.**, **77**: 1233-1239, 1982.
- ROSSKLOPF, W. & WOERPEL. R. – Avian hematology. **Proc. Am. Assoc. Zoo. Vet.**, 134-143, 1983.
- ROSSKLOPF, W. & WOERPEL. R. - **Diseases of Cage and Aviary Birds**. 3rd Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1996. p.1059.
- RUPLEY, A.E. - **Manual of Avian Practice**. WB Saunders Co., Philadelphia, 1997. p. 345-360.
- RUSCH, P.G. & MOORE, T.G. – Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: a phylogenetic comparison. **Blood**, **46**: 913-919, 1975.
- SASSO, W.S. & EGAMI, M.I. – Observações citoquímicas em células do sangue periférico de *Bufo ictericus* (Amphibia, Anura). **Rev. Bras. Ciên. Morfol.**, **3** (1): 27-30, 1986.

- SIMPSON, C.F. – Ultrastructural features of the turkey thrombocyte and lymphocyte. **Poult. Sci.**, **41**: 848-849, 1967.
- SREERAMAN, P.K; AHMAD, M.N; RAO, P.R & SASTRY, G.A. Hematology of ducks. **Indian. Vet. J.**, **56** (2): 100-104, 1979.
- SRIRAMAN, A.K. et al. – Citochemical observations on the peripheral blood cells of chicken and ducks. **Indian Vet. J.**, **58**: 605-608, 1981.
- STELMASZYNSKA, T. et al. – Possible involvement of myeloperoxidase in lipid peroxidation. **Int. J. Biochem.**, **24** (1): 121-128, 1992.
- STOKIES, E.E. & FIRKIN, B.G.T. – Studies of the peripheral blood of the port jackson shark (*Heterodontus portusjacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. **Br. J. Haematol.**, **20**: 427-435, 1971.
- STUERMER-Jr, K.J. – Perfil hematológico de cisnes brancos (*Cygnus olor*) e cisnes negros (*Cygnus atratus*) do Parque do Ibarapuera, São Paulo. **Comunicação pessoal**, 1999.
- STURKIE, P.D. - Blood: Physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. In: Sturkie PD, (Ed.): **Avian Physiology**. Springer-Verlag, New York, 1976, pp 53-75.
- SWAYNE, D.E.; STOCKHAM, S.L. & JOHNSON, G.S. – Cytochemical properties of chicken blood cells resembling both thrombocytes and lymphocytes. **Vet. Clin. Pathol.** **15** (2): 17-24, 1986.

- SWEENEY, P.R. & CARLSON, H.C. - Electron microscopy and histochemical demonstration of lysosomal structures. in chicken thrombocytes. **Avian Dis.** **12** (4): 636-& 1968.
- TAFFAREL, M. & OLIVEIRA, M.P. – An endocytic route for gold-conjugated albumin in avian thrombocytes. **Ciência e Cultura** **44**: 387-390, 1992.
- TAFT, S.J.; ROSENFELD, R.N. & EVANS, D.L. – Hematozoa in autumnal migrant raptor from the hawk ridge nature reserve, Duluth, Minnesota. **J. Helmith. Societ. Washington** **63** (1): 141-143, 1996.
- TENDEIRO, J. – Observations sur deux kurodaia (Mallophaga, Menoponidae), parasites des Falconiformes, avec description d’une nouvelle espece, ou Brésil. **Série de Zoologia** **15** (2): 163-169, 1990.
- TOPP, R.C. & CARLSON, H.C. - Studies on avian heterophils .2. histochemistry. **Avian Dis.** **16**(2): 369-380,1972.
- UEDA, I.K. - Aspectos morfológicos, citoquímicos e hematométricos do sangue periférico de *Oreochromis niloticus* (tilápia) (Linneus, 1750). **Braz. J. Vet.** **2001** – no prelo.
- VAN-WYK, E. & VAN-BANK, H. – Dynamics of haematology and blood biochemistry in free-living African whitebacked vulture (*Pseudogyps africanus*) nestlings. **Comp. Bioch. Physiol.**, **120** (3): 495-508, 1998.
- VEIGA, M.L. – Aspectos morfológicos das células sangüíneas, citoquímicos e ultra-estruturais de trombócitos, neutrófilos e eosinófilos de dourado *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, characidae). São

Paulo, 1999. [Tese Mestrado – Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina].

WATSON, M.L. – Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biochem. Cytol.**, **4**: 475-8, 1958.

WITKOWSKI, A. & THAXTON, J.P. – Morphology of the eosinophil in japanese quail. **Poult. Sci.** **60**: 1587-1590, 1980.

ZINSMEISTER, V.A.P. – Light microscopic study of granulocytes of pygoscelid penguins (*Pygoscelis adeliae*) if Antarctica. **Am. J. Vet. Res.** **49** (8): 1402-1406, 1988.

FONTES CONSULTADAS

HERANI, M.L.G. – Normas para a apresentação de dissertações e teses. São Paulo, BIREME, 1990.

RESUMO

O Gavião carijó, *Buteo magnirostris* é uma das espécies de ave brasileira, cujos interesses estão prioritariamente voltados às pesquisas de natureza ecológica, taxonômica e de hábito alimentar. Quanto ao estudo do sangue periférico deste animal não foi possível constatar nenhuma referência de dados relativos à morfologia, citoquímica e à ultra-estrutura das células sangüíneas. **Objetivo:** Analisar os aspectos morfo-citoquímico das células sangüíneas e ultra-estrutural de trombócitos e granulócitos do Gavião carijó *Buteo magnirostris*. **Métodos:** Foram utilizados doze exemplares provenientes do Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE) da Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente do Município de São Paulo. Amostras de sangue periférico foram colhidas e imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo EDTA. Parte do volume foi utilizado para aplicação do corante vital pelo método de Laür, para a realização de extensões e aplicação dos métodos de Leishman e citoquímicos. O volume restante foi rapidamente centrifugado, o creme leucocitário fixado em Karnovsky e processado para a microscopia eletrônica de transmissão. **Resultados e Conclusões:** Após a aplicação dos métodos para análise estrutural, foi identificado no sangue periférico de *Buteo magnirostris* os seguintes tipos de células: eritrócitos, reticulócitos, trombócitos, três tipos de granulócitos (heterófilo, eosinófilo, basófilo) e dois tipos de leucócitos agranulócitos (monócito e linfócito). Quanto aos resultados citoquímicos foram observados: a) presença de glicogênio sob forma de grânulos no citoplasma dos trombócitos, heterófilos e eosinófilos; b) proteínas ricas em aminoácidos básicos nos heterófilos e eosinófilos; c) presença da mieloperoxidase nos eosinófilos; d) fosfatase ácida positiva nos trombócitos, heterófilos e linfócitos; e) sudanofilia nos grânulos dos eosinófilos. Ultra-estruturalmente foram identificados trombócitos elípticos pequenos, com núcleo parcialmente heterocromático e trombócitos esféricos grandes com núcleo

predominantemente eucromático. Ambos os tipos apresentam características citoplasmáticas semelhantes, isto é, presença de vacúolos com grânulos pequenos elétron-densos, mitocôndrias, riqueza em vesículas do sistema tubular e microtúbulos marginais. Heterófilos esféricos, com núcleo chanfrado ou lobulado, caracterizado por apresentar grande quantidade de grânulos predominantemente fusiformes elétron-densos e outros menores variando quanto à forma, tamanho e elétron- densidade. Eosinófilos com núcleo lobulado e citoplasma com numerosos grânulos esféricos de tamanho considerável uniformemente elétron-densos. Basófilos com núcleo não lobulado, central, levemente indentado com nucléolo central e o citoplasma contendo três diferentes tipos de grânulos identificados de acordo com a elétron-densidade e o aspecto da matriz do grânulo.